UNIVERSITE DE LYON
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N° 98 492

HEMAGGLUTINATION par CERTAINS TYPES de VIRUS ECHO

Bilan critique des faits acquis et recherches

Travail de Laboratoire d'Hygiène
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie (Professeur R. SOHIER)

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de Lyon
LE 26 JUIN 1962

par

Anne-Marie BARRAL-VANEL
Pharmacien
Diplômée de SEROLOGIE,
BACTERIOLOGIE
PARASITOLOGIE
BIOCHIMIE DESCRIPTIVE

Née le 12 mars 1935 à GAP (Hautes-Alpes)

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N° 98

HEMAGGLUTINATION par CERTAINS TYPES de VIRUS ECHO

Bilan critique des faits acquis et recherches

Travail de Laboratoire d'Hygiène
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie (Professeur R. SOHIER)

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de Lyon
LE 26 JUIN 1962

par

Anne-Marie BARRAL-VANEL
Pharmacien
Diplômée de SEROLOGIE,
BACTERIOLOGIE
PARASITOLOGIE
BIOCHIMIE DESCRIPTIVE

Née le 12 mars 1935 à GAP (Hautes-Alpes)

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON

P E R S O N N E L DE LA F A C U L T E

M. J. LEPINE : Doyen Honoraire
membre de l'Institut

M. H. HERMANN : Doyen
Correspondant de l'Institut

MM. M. LEVRAT, Assesseur
L. REVOL, Assesseur

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

PROFESSEURS

MM.	HERMANN	Physiologie
	CIBERT	Clinique urologique
	PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique
	DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale
	ROCHET	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
	CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
	WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B
	PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
	FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
	CROIZAT	Clinique médicale C
	ENSELME	Chimie biologique et médicale
	MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
	GUILLEMINET	Clinique de chirurgie orthopédique et de chirurgie infantile
	REVOL	Pharmacie galénique et matière médicale
	POLLOSSON	Clinique gynécologique
	PIGEAUD	Clinique obstétricale
	BOURRET	Médecine du travail
	LEVRAT	Clinique Médicale A
	SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
	DUCLOS	Clinique stomatologique
	BERNHEIM	Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge
	JOURDAN	Biologie médicale et pharmacodynamie
	NETIEN	Botanique et cryptogamie
	BERTRAND	Clinique chirurgicale C
	BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
	DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
	ROCHE	Médecine légale et déontologie

.../.

MM.	COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
	MOUNIER-KUNH	Clinique d'Oto-Rhino-Laryngologie et d'Audio-Phonologie
	PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
	THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
	BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
	CREYSSEL	Clinique traumatologique des membres
	DARGENT	Cancérologie
	GUICHARD	Anatomie pathologique
	GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
	LATARJET	Anatomie
	PEYCELON	Pathologie chirurgicale
	GIRARD Marcel	Thérapeutique
	VACHON	Pathologie médicale
	GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
	KEHL	Histologie et embryologie
	PAPILLON	Radiologie
	JEUNE	Clinique des maladies infectieuses
	GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
	MONNET	Bactériologie
	BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
DORCHE	Technologie pharmaceutique
CIER J. François	Physiologie
BERTOYE	Bactériologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

ROMAN	Parasitologie
CHATONNET	Physiologie
CIER André	Pharmacie chimique et pharmacologie
PERROT	Chimie organique et toxicologie

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

Médecine

FEROLDI	Anatomie pathologique
CREYSSEL Roger	Chimie biologique et médicale
DUROUX Emile	Anatomie
BRETTE René	Thérapeutique
DUMONT Louis	Histologie
THIVOLET Jean	Hygiène
GARIN Jean-Paul	Parasitologie
MORET Robert	Physique

.../.

MM.	BOUCHET Alain	Anatomie
	TOMMASI Michel	Anatomie pathologique
	RIFFAT Georges	Hygiène
	JOUVET Michel	Pathologie expérimentale
	FAVRE-GILLY Jean	Hématologie

Pharmacie

ODDOUX Lucien	Botanique et cryptogamie
MALLEIN René	Chimie analytique
GRAS Jean	Chimie biologique
PEYRIN Jean-Olivier	Physique

AGREGES EN EXERCICE

GUINET Paul	Médecine générale
PONT Maurice	Médecine générale
VIGNON Georges	Médecine générale
REVOL Louis	Médecine générale
PLAUCHU Marcel	Médecine générale
TRAEGER Jules	Médecine générale
MARION Pierre	Chirurgie générale
MICHAUD Pierre	Chirurgie générale
JAUBERT de BEAUJEU Michel	Chirurgie générale
SAUTOT Jean	Chirurgie générale
GUILLEMIN Georges	Chirurgie générale
BURTHIAULT René	Obstétrique
GIGNOUX Marcel	Oto-Rhino-Laryngologie
FRANCOIS René	Pédiatrie
FREIDEL Charles	Stomatologie
DEVIC Michel	Médecine générale
DESPIERRES Charles	Médecine générale
De MouRGUES Georges	Chirurgie générale
FRANCILLON Jacques	Chirurgie générale
SAUBIER Eugène	Chirurgie générale
COLOMB Daniel	Dermatologie
COLIN Marcel	Médecine légale
TOLOT François	Médecine du travail
GUYOTAT Jean	Neuro-Psychiatrie
SCHOTT Bernard	Neuro-Psychiatrie
DUMONT Martial	Obstétrique
BONAMOUR Georges	Ophtalmologie
DURAND Louis	Urologie

.../.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550005_0038

MM.	GARDE Alexandre	Médecine générale
	PERRIN André	Médecine générale
	LARBRE François	Médecine générale
	MORNEX René	Médecine générale
	NORMAND Jean	Médecine générale
	MARET Gilbert	Chirurgie générale
	DESCOTES Jacques	Chirurgie générale
	CHASSARD Jean-Louis	Electro-radiologie
	ALLEGRE Georges	Neuro-chirurgie
	HUGONNIER René	Ophtalmologie
	FAYSSE Robert	Orthopédie
	GAILLARD Jean	Oto-Rhino-Laryngologie
	KALB Jean-Claude	Pneumo-Phtisiologie

EXAMINATEURS DE LA THESE :

MM. SOHIER R.

REVOL L.

DORCHE J.

THIVOLET J.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur SOHIER

Nous le remercions d'avoir bien voulu nous accueillir dans son laboratoire et nous confier le sujet de ce travail auquel il s'est toujours intéressé avec beaucoup de bonté.

Sa rigueur scientifique, son travail persévérant et enthousiaste resteront pour nous un exemple.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect et de notre sincère attachement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur REVOL

Il nous a, tout au cours de nos études, constamment manifesté sa bienveillance et prodigué ses conseils avertis. Au cours d'une année passée à la Pharmacie de l'Hôpital du Vinatier, nous avons pu plus particulièrement profiter de son enseignement.

Qu'il nous autorise à lui exprimer notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur DORCHE

Nous le remercions de l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'être notre juge, et l'assurons de notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur Agrégé THIVOLET

Au cours de trois années passées au laboratoire d'Hygiène, il nous a toujours manifesté sa bienveillante amabilité.

Nous le remercions de bien vouloir juger ce travail.

A Madame le Docteur GAUDIN

Elle nous a guidé, pas à pas, tout au long de ce travail, nous dispensant son temps sans compter, nous prodiguant de judicieux conseils.

Nous avons pu apprécier ses très grandes connaissances dans cette science complexe qu'est la virologie.

Qu'elle soit infiniment remerciée pour l'intérêt qu'elle nous a manifesté et l'amitié qu'elle nous a accordée.

Aux membres du Laboratoire d'Hygiène

Nous les remercions de l'accueil qu'ils nous ont réservé parmi eux.

Nous tenons à remercier plus particulièrement Mesdemoiselles BOBILLON et FORESTIER de l'aide qu'elles nous ont apportée au cours de ce travail.

A MON MARI

A MES PARENTS

A MON FRERE

A MA FAMILLE

A MES AMIS

I N T R O D U C T I O N

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

STEIGMAN, KOKKO et SILVERBERG (63) en I953 isolent des selles d'un enfant atteint de méningite aseptique un agent pathogène pour les cultures de reins de singe et qui n'était neutralisé ni par les sérums antipoliomyélitiques, ni par les sérums anti-coxsackie, ni par les sérums antiadénovirus.

Furent ensuite isolés de nombreux entérovirus dont le rôle pathogène était inconnu, appelés pour cela virus orphelins : "enteric cytopathogenic human orphan" ou virus ECHO.

MELNICK décrivit les premiers sérotypes : ECHO type 1 isolé de sujets apparemment sains, types 2, 3, 4, 5, 6 responsables de méningite à liquide clair.

RAMOS-ALVAREZ et SABIN (48, 49, 50)décrivent les sérotypes 7 à 11, HAMMON et LUDWIG I2 et I3 (20).

En I955 le Comité des Entérovirus différencie I3 types par leur structure antigénique.

Puis, à la suite des travaux de KIBRICK et ENDERS, MELNICK, RAMOS-ALVAREZ et SABIN, de nouveaux types s'ajoutent à la liste précédente et en I957 sont décrits I9 types de virus ECHO.

Actuellement il existe 29 sérotypes de virus ECHO d'origine humaine, deux nouveaux candidats sont en instance d'admission. L'ECHO type IO a été supprimé récemment de la liste des virus ECHO pour être classé avec les Réovirus de par sa taille et ses propriétés différentes des autres virus ECHO.

Récemment les virus ECHO ont été classés parmi les NANI VIRUS groupant dans un même système les virus poliomyélitiques, coxsackie et ECHO (4I).

Tous les types de virus ECHO proviennent d'isolement à partir de selles et plus rarement de lavages de gorge d'êtres humains.

D'après les nombreux travaux et en particulier ceux d'ARCHETTI et FELICI (2), on peut ainsi établir actuellement leur rôle pathogène :

- responsables de méningites aseptiques
  ECHO type 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, I4, I6 et 2I
- responsables d'exanthème
  ECHO types 9 et I6 et I8, et possibilité types 2, 4, 6, 7, 8, 11, I4 et 29,
- responsables de diarrhées estivales
  ECHO types I4, I8, I9, 22, 23 et 24.
- responsables de maladies respiratoires
  ECHO type 11, 20, 25 et 28.

Leurs principales propriétés peuvent être ainsi schématisées :

- Leur dimension est comprise entre I5 et 30 mμ.
- Ils résistent à l'éther.
- Ils sont pathogènes pour les cellules de reins de singe : Macacus rhesus et Papiopapio principalement.

- Ils ne sont pas pathogènes pour le souriceau nouveau-né (exception faite pour l'ECHO type 9) mais peuvent être pathogènes pour l'homme et le singe.

Outre ces caractéristiques générales et communes à tous les types, certains d'entre eux possèdent une hémagglutinine les rendant aptes à agglutiner les hématies humaines de groupe O.

C'est dans l'étude des propriétés hémagglutinantes de certains types de virus ECHO et de leurs applications pratiques que réside le sujet de notre travail.

La première description de ce phénomène d'agglutination des globules rouges est celle de HIRST (24, 25) qui, en I94I, observa l'agglutination spontanée des hématies d'embryon de poulet par des liquides d'oeuf infectés par le virus grippal, ces hématies s'étant trouvées mêlées accidentellement à ces liquides par rupture de vaisseaux au moment de la récolte.

Cette observation suscita de très nombreux travaux qui portèrent principalement sur le virus grippal, puis ultérieurement sur les pox-virus (variole - vaccine), les virus Arbor (encéphalites transmises par les arthropodes) et plus récemment sur certains virus simiens, parasites spontanés des cultures cellulaires de reins de singe, puis sur les adénovirus et les nani-virus (poliomyélite - Coxsackie, ECHO).

La découverte du pouvoir hémagglutinant des virus ECHO est d'acquisition très récente puisque les travaux qui en font état pour la première fois datent de I957 : ce sont ceux de GOLDFIELD, SRIHONGSE et FOX (I7, I8).

Ces auteurs, à la suite de la découverte par PELON et ses collaborateurs (43) d'un virus respiratoire 2060 rattaché depuis au groupe des virus ECHO sous le numéro 28, virus capable d'agglutiner les globules rouges humains trypsinés, essayèrent de retrouver pour d'autres types de virus ECHO cette propriété hémagglutinante.

Ils s'aperçurent que les hématies humaines de groupe O non traitées par la trypsine, engagées comme témoins dans la réaction étaient agglutinées par certains types de virus ECHO : ECHO types 3, 6, 7, IO, 11, I2.

LAHELLE (34) en I958 publie une étude sur les propriétés hémagglutinantes de la souche ECHO type 6. Il teste à la fois la souche prototype d'AMORI et 5I souches isolées de cas de méningites aseptiques et il décrit l'inconstante hémagglutination provoquée par ces souches.

Dans un autre travail, en I958, LAHELLE (33) décrit l'inbition de l'hémagglutination des types 3, 6, 7, 11, I3 et I9 par des antisérums spécifiques de singe et de lapin. Il envisage l'intérêt de ces épreuves d'inhibition pour le typage des virus ECHO.

La même année, DARDANONI et ZAFFIRO (11, I3) étudient le pouvoir hémagglutinant des virus ECHO.

En I959, PHILIPSON (45) publie un travail sur un agent hémagglutinant qu'il avait isolé en I957 de lavages de gorge et de selles d'enfants atteints de laryngotrachéobronchite, agent qu'il n'identifie pas, mais qu'il appelle virus U du nom de la ville d'UPSALA où ce virus a été isolé. Il retrouve ce virus chez 11 % d'enfants sains d'une pouponnière. Ce virus U s'avéra être un ECHO type 11.

DARDANONI et ZAFFIRO (11) en I959 décrivent les modalités techniques de la réaction d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination par les virus ECHO. DARDANONI (I2) envisage l'intérêt de ce phénomène d'hémagglutination, intérêt à la fois théorique et pratique :

- théorique, car il faciliterait la classification du groupe des virus ECHO encore très hétérogène en distinguant :

. virus hémagglutinant : 3, 6, 7, I0, 11, I2 et I9.

. virus non hémagglutinant : 1, 2, 4, 5, 8, 9, I3, I4, I5, I6, I7, I8, 20, 2I, 22, 23 et 24.

- pratique, car les réactions d'hémagglutination et d'inhibition sont d'une réalisation beaucoup plus simple que les réactions de neutralisation en culture de tissus, ces dernières étant toujours les réactions de référence.

PHILIPSON (45) en I959 détermine le mécanisme de l'hémagglutination par les virus ECHO. Il suggère que les récepteurs de virus ECHO sur l'hématie sont différents de ceux des myxovirus, ces récepteurs étant susceptibles d'être détruits par la chymotrypsine contrairement aux récepteurs de myxovirus détruits par le filtrat de vibrion cholérique (RDE)..

LIPPI, BALDUCCI et BENEDETTO (36) en I960 font une étude parallèle des anticorps fixant le complément et inhibant l'hémagglutination du virus ECHO type 11, sur un échantillon de sujets sains.

BUSSELL, KARZON et HALL (6) en I962 déterminent un certain nombre de facteurs intervenant dans l'élaboration de l'hémagglutinine des virus ECHO. Dans un autre travail, ils suivent l'évolution des anticorps neutralisants, inhibant l'hémagglutination et fixant le complément au cours de méningites aseptiques dues au virus ECHO type 6.

En I959 nous entreprimes une étude du phénomène d'hémagglutination provoquée par les virus ECHO en nous inspirant en particulier des travaux de GOLDFIELD, LAHELLE et DARDANONI.

Ce travail nous fut confié dans le but de simplifier l'identification des virus ECHO. En effet, celle-ci est particulièrement longue et complexe, puisqu'il y a actuellement 29 types de virus ECHO et que d'autres sont près d'être intégrés dans ce groupe. Une identification de virus ECHO par la méthode de neutralisation demande un matériel important, en particulier un très grand nombre de tubes de cultures de tissu, la manipulation est longue et relativement astreignante par les précautions de stérilité qu'elle nécessite. Enfin les résultats ne sont obtenus qu'après un délai minimum de 7 jours.

Nous avons abordé ce travail dans le but de mettre au point la réaction d'hémagglutination, permettant une identification simple et rapide des virus ECHO présentant cette propriété.

Nous avons étudié, tour à tour, chacun des facteurs capables de l'influencer, chaque modalité de la réaction étant vue à la fois pour les virus connus comme hémagglutinants et pour ceux qui n'hémagglutinaient pas, dans l'espoir de révéler par tel ou tel moyen une hémagglutinine.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, complément indispensable de la réaction d'hémagglutination pour en démontrer la spécificité. Après avoir surmonté le problème des inhibiteurs non spécifiques qui nous a arrêtés quelque temps, nous avons mis en oeuvre cette réaction d'inhibition qui nous permettait à la fois de juger des sérums immuns que nous préparions, et à partir de ces sérums d'effectuer le typage des virus ECHO hémagglutinants isolés.

Enfin, autre application pratique intéressante de la réaction d'inhibition, elle permet la recherche des anticorps développés au cours d'une affection à virus ECHO.

- CHAPITRE PREMIER -

ETUDE DE LA REACTION D'HEMAGGLUTINATION

A - MATERIEL ET TECHNIQUES

1) - Les souches

Au cours de ce travail, nous avons utilisé tous les types de virus ECHO de 1 à 29, il s'agissait soit de souches prototypes, soit de souches isolées au laboratoire, soit de souches isolées dans d'autres laboratoires et qui nous avaient été envoyées (º). L'ECHO type 2 Cornelis n'a pu se multiplier en culture de tissus et par suite ne rentre pas dans cette étude.

Certaines des souches utilisées avaient été purifiées sur plaques : tel était le cas des types :

1	FAROUK
4	PESASCEK
7	GARNETT
II	GREGORY
I5	CHARLESTON
6'	DI MEO
I4	TOW

(º) - Nous tenons à remercier ici tout particulièrement :

- le Docteur NUNEZ MONTIEL, Istituto Venezolano de Investigaciones Cientificas - Caracas (Venezuela) pour l'envoi des souches types I a 20, 23, 25, 26 et 29.
- le Professeur DARDANONI, Istituto d'Igiene e microbiologia di Palermo, pour l'envoi de la souche prototype 3 Morrisey.
- le Docteur PACCAUD, Service des virus de l'Institut Pasteur-Paris, pour l'envoi des types 2I, 22, 24 et 27.
- le Professeur PELON, Viral Division Naval Medecine - Greatlakes (Illinois) pour l'envoi de la souche ECHO 28 (souche 2060)
- le Docteur OPTON, Yale University - Newhaven (Connecticut) pour l'envoi des types I, 7, 8, I0, II et I6.

I6 HARRINGTON
I7 CHHE - 29
I9 BURKE

L'ECHO type IO devenu maintenant Réovirus n'entre pas dans le cadre de notre étude. L'isolement des souches obtenues au laboratoire d'Hygiène a été fait à partir de selles de malades selon la technique utilisée au laboratoire d'Hygiène (R. SOHIER et coll.-64-). Le bilan des souches engagées dans les réactions d'hémagglutination est fait dans le tableau I.

2) - Méthode de cultures

Les souches de virus ECHO pour lesquelles nous avons réalisé l'étude du pouvoir hémagglutinant sont cultivées sur cellules de reins de babouin (Papio-papio).

La trypsination des reins de singe s'effectue selon la technique habituelle : les reins sont prélevés stérilement sur le singe venant d'être sacrifié. Les reins sont décapsulés, coupés en morceaux d'environ 1 mm3 et lavés en solution de HANKS jusqu'à ce que le surnageant soit clair. On effectue une série de trypsination de 6 minutes, dans un appareil à circuit continu, en utilisant une trypsine à 0,I5% en solution de HANKS. Les culots cellulaires recueillis au cours de chaque trypsination sont placés dans un milieu d'attente ainsi préparé :

Hydrolysat lactalbumine	0,5 % en solution HANKS
Sérum poulain	IO %
Pénicilline	IOO unités/ml milieu
Streptomycine	50 γ/ml milieu.

On inocule alors des tubes avec 200.000 cellules par ml et des boîtes de ROUX avec 50 à 70 millions de cellules pour 80 ml de milieu.

Virus ECHO Type	Souches prototypes étudiées	Souches reçues autres que les prototypes	Souches isolées au laboratoire
I	FAROUK	I	I
2	CORNELIS		
3	MORRISEY (2)		
4	PESASCEK	2	I
5	NOYCE		
6	D'AMORI	I)	
6'		DIMEO)	8
6"	BURGESS	)	
7	WALLACE	I (GARNETT)	I
8		I	
9	HILL	2	4
II	GREGORY (2)		I
I2	TRAVIS 2 - 85		
I3		I	
I4	TOW		2
I5	CHARLESTON		
I6		I	
I7	CHHE 29		
I8	METCALF		
I9	BURKE		6
20	JV I		
2I	FARINA		
22	HARRIS		
23		I	
24	DEL CAMPO		
25		I	
26		I	
27		I	
28	2060		
29	JV - IO		
Total	6I souches	22 souches	I5 souches	24 souches

Tableau nº I -

En 5 jours environ, la nappe cellulaire est confluente. Au moment de l'inoculation des tubes ou des boîtes par le virus, le milieu de départ est remplacé par le milieu de survie suivant :

Hydrolysat lactalbumine 0,5 % en solution de HANKS
Liquide amniotique de bovidés 30 %
Pénicilline IOO unités/ml milieu
Streptomycine 50 γ/ml milieu.

On inocule les tubes ou les boîtes avec le virus pur ou dilué : nous verrons dans un paragraphe suivant que les doses de virus avec lesquelles nous inoculions les tubes et les boîtes ont changé au cours de nos expériences, après que nous nous soyions aperçu, que plus la dose inoculée était faible, mieux se développait l'hémagglutinine. Les boîtes de Roux ou les tubes sont placés à l'étuve à 35 º, on surveille chaque jour leur dégénérescence. Lorsque la dégénérescence des cellules est totale, les liquides cellulaires sont recueillis, répartis sous faible volume (1 ml) et congelés à - 20º C. Dans certains cas, nous avons séparé les cellules et le liquide surnageant par une centrifugation de 20 minutes à 3500 tours sur centrifugeuse de type JOUAN, puis décantation. Sur les liquides obtenus, on effectue le titrage du pouvoir infectieux : le virus à titrer est dilué en progression logarithmique et 0,I ml de chaque dilution est introduite dans 5 tubes de culture de reins de singe contenant déjà 0,9 ml de milieu de survie. Les tubes sont placés à l'étuve à 35 º et examinés à 1 jour, 4 jours et 7 jours. On note les effets cytopathogènes en croix (de + à ++++) correspondant de 25 % à IOO % d'effet cytopathogène. Sont comptés comme positifs, seuls les tubes dont la dégénérescence est notée au moins ++. Le titre infectieux est calculé d'après la méthode de REED et MUENCH, il est exprimé en dose 50 % ou DICT 50 (dose infectieuse en culture de tissu).

3) - Préparation des hématies

Le sang total de l'espèce utilisée est recueilli sur la solution d'Alsever anticoagulante et conservatrice, on recueille un volume de sang total pour un volume de solution d'Alsever contenant :

Glucose	20,05 g
Chlorure de sodium	8 g
Citrate trisodique 5 H_2O	4,20 g
Eau bidistillée	I litre

Le pH est ajusté à 6,I avec une solution d'acide citrique à 5 %. On stérilise par tyndallisation en chauffant à IOOº 3 jours de suite 30 minutes. Le sang O Rh + est prélevé à la veine du pli du coude chez les donneurs humains. Chez le singe,le sang est prélevé par ponction cardiaque (º). La durée d'utilisation d'un lot d'hématies conservées en solution d'Alsever était d'environ I5 jours à 3 semaines.

Le jour de la réaction, le mélange sang total + Alsever est centrifugé une première fois après homogénéisation pour éliminer le plasma et la solution d'Alsever (centrifugation : IO minutes, 3000 tours). Le culot est recueilli après décantation du surnageant et lavé 3 fois de la même manière en présence de 5 parties de tampon phosphate. Pour chaque lavage on agite le mélange hématies + tampon par 2 ou 3 retournements sur le pouce en évitant d'agir brusquement. On centrifuge chaque fois IO minutes, 3000 tours. Le culot d'hématies est enfin recueilli et dilué en tampon phosphate de manière à obtenir une suspension à 0,5 %.

Le pourcentage de la suspension d'hématies utilisée au cours des réactions d'hémagglutination des virus ECHO varie sensiblement selon les auteurs.

(º) - Nous remercions ici le Docteur NICOLAS qui nous a fourni les hématies de singe (Erythrocebus patas, Cercopithecus, Athiops , et Papiopapio) utilisées au cours de nos réactions.

PHILIPSON (45) utilise une suspension à 0,I25 %.

LAHELLE (33) d'une part, LIPPI, BALDUCCI et BENEDETTO (36) d'autre part, emploient une suspension à 0,25 %.

BUSSELL, HARZON et HALL (6) travaillent avec des hématies diluées à 0,5 %.

DARDANONI et ZAFFIRO (II) ont utilisé simultanément les deuxspourcentages de 0,5 et I % et ont obtenu des résultats identiques.

Nous avons constamment employé une suspension d'hématies à 0,5 %.

Conservation des hématies lavées :

La suspension globulaire a, dans la plupart de nos expériences, été préparée extemporanément. Cependant, il a été possible de conserver le culot d'hématies lavées à + 4º, les hématies dans ces conditions, étaient utilisables dans un délai de 24 à 48 heures.

4) - Le diluant

Les divers auteurs ont utilisé comme diluant dans les réactions d'hémagglutination par les virus ECHO soit une solution tampon phosphate, soit une solution tampon véronal, soit simplement de l'eau physiologique. GOLDFIELD (I8) utilise un tampon véronal à pH 7,3. DARDANONI et ZAFFIRO (II) emploient un tampon véronal à pH 7,2. LAHELLE (33) travaille avec un tampon phosphate à pH 7,0. BUSSELL, KARSON et HALL (6) avec un tampon phosphate à pH 7,2. PHILIPSON (45) utilise de l'eau physiologique à 0,85 %.

Au cours de notre travail, nous avons employé un tampon phosphate nous servant aux dilutions de virus et d'hématies. Nous utilisions deux solutions mères de phosphate disodique et monopotassique que nous conservions.

Solution de PO_4Na_2H à 43,25 g ‰

PO_4H_2K à 22 g ‰

Ces solutions nous permettaient selon les proportions dans lesquelles nous les mélangions d'avoir une gamme de pH allant de 5,2 à 7,8 (tampons de CLARK).

pH	Solution de PO_4Na_2H à 43,25 ‰ en ml	Solution de PO_4H_2K à 22 g ‰ en ml	ClNa à 0,85 ‰
5,288	I0,95	804,6	
5,589	2I,9	784,0	Q.S.
5,906	43,8	742,7	
6,239	87,5	660,2	pour
6,468	I3I,3	577,7	
6,643	I75,I	495,I	I000 ml
6,8I3	2I8,9	4I2,6	
6,973	263,5	330,I	
7,I68	306,4	247,5	
7,38I	350,7	I65,05	
7,73I	393,0	82,5	

Pour les **pH** allant de 7,8 à 9 nous utilisions les solutions tampons borates de CLARK et LUB préparées à partir de :

BO_3H2	0,2 M	I2,5 ml
KCl	0,2 M	I2,5 ml
NaOH	x ml dilués à 50 ml en eau physiologique.	

pH	x ml 0,2 M NaOH
7,8	0,66
8	I
8,2	I,47
8,4	2,I3
8,6	4
8,8	4,I

Avant de déterminer le pH auquel nous allions travailler, nous avons titré l'hémagglutinine des virus ECHO, à des pH allant de 5,8 à 9 et à des températures variables : 4º, 20º, 37º. Ces expériences sont relatées dans un chapitre suivant, ainsi que les conclusions que nous en avons tirées.

5) - Titrage de l'hémagglutinine - Lecture des réactions

L'hémagglutinine provient soit du liquide cellulaire total, soit du liquide cellulaire après centrifugation et élimination des cellules. Les dilutions du virus sont faites en tampon phosphate, dilutions en progression géométrique décroissante de raison 2. Chaque tube reçoit ensuite 0,5 ml de la suspension globulaire à 0,5 %, le volume final étant de I ml. Les réactions sont faites en tubes de 65 x I3 mm dits "tubes à hémolyse". Pour chaque réaction, est fait un témoin hématie recevant 0,5 ml de tampon phosphate, 0,5 ml de suspension globulaire, preuve de la bonne conservation des hématies utilisées.

	I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0
Virus pur	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tampon phosphate	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilution virus	$\frac{I}{2}$	$\frac{I}{4}$	$\frac{I}{8}$	$\frac{I}{I6}$	$\frac{I}{32}$	$\frac{I}{64}$	$\frac{I}{I28}$	$\frac{I}{256}$	$\frac{I}{5I2}$	$\frac{I}{I024}$
Suspension d'hématies 0,5 %	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

La lecture s'effectue après un séjour de 3 heures à 4º, cette température étant la plus favorable à l'ensemble des virus ECHO hémagglutinants comme notre étude ultérieure le montrera. La réaction est notée d'une croix à quatre croix, selon l'intensité des agglutinats examinés au miroir concave.

Lorsque la réaction est négative, les hématies présentes dans les tubes réaction sont semblables à celles du témoin globules rouges, elles forment une pastille parfaitement régulière au fond du tube, circulaire, sans déformation. La réaction est notée d'une croix lorsque de petits agglutinats sont visibles autour du culot d'hématies dont les bords sont encore réguliers. Lorsque les agglutinats sont plus nombreux et que la pastille devient moins homogène, à bords crenelés, la réaction est notée deux croix. Elle est notée trois croix si le culot d'hématies ayant complètement disparu, tous les globules rouges sont agglutinés et tapissent régulièrement le fond du tube. La réaction est notée quatre croix lorsque les bords de la pellicule formée par les hématies agglutinées commencent à retomber et reconstituent alors une pastille hétérogène constituée uniquement d'agglutinats (qu'il ne faut pas confondre avec une réaction négative). On définit l'unité hémagglutinante comme la plus haute dilution qui agglutine au moins 50 % des hématies, ce qui correspond à une hémagglutination notée en croix à 2 croix et demi.

6) - Problème du lavage du matériel

Au cours de ces réactions hemagglutinations, il est important d'utiliser un matériel parfaitement propre ; en effet, une verrerie insuffisamment lavée ou exposée longuement à la poussière, peut être la cause de réactions faussement positives.

La technique de lavage utilisée a été la suivante : les tubes sont immergés dans un récipient contenant de l'eau additionnée de soude à raison de IO g de soude pour IO litres. Après ébullition de IO minutes, les tubes sont écouvillonnés avec soin, puis rincés à l'eau chaude. On les immerge à nouveau dans un bain acidulé à raison de I litre de ClH pour IO litres d'eau pendant une nuit. Les tubes sont rincés à l'eau chaude IO fois de suite en les immergeant complètement, puis mis à tremper dans de l'eau permutée une nuit. Ils sont enfin séchés aux infrarouges.

B - ETUDE DES CARACTERES DES HEMAGGLUTININES DES VIRUS ECHO

I -/Etude des hématies agglutinables par les virus ECHO/

1 - Hématies non modifiées

Faits publiés

GOLDFIELD et ses collaborateurs (I8) utilisant des hématies humaines de groupe O ont décrit comme hémagglutinants :

- les virus ECHO type 3, 6, 7, I0, II et I2
- les virus Coxsackie B3

Les souches ECHO I, 2, 5, 8, 9, I3 et I4 qu'ils testent, ne possèdent aucune activité, les souches Coxsackie BI, B2, B4, l'ECHO type 4 possèdant une très faible activité agglutinante.

LAHELLE (33,34) au cours de ses travaux en I958 utilise également des hématies humaines de groupe O. Il trouve un pouvoir hémagglutinant chez les virus ECHO type 3, 7, II, I3 et I9. Il signale pour les virus ECHO de type 6 des propriétés hémagglutinantes inconstantes, la souche prototype d'Amori, bien que d'un haut titre infectieux, n'hémagglutine pas alors que d'autres souches de type 6, isolées de méningite aseptique sont douées de pouvoir agglutinant.

LAHELLE essaie l'agglutination des hématies de mouton, de poule, de cobaye sans résultats.

DARDANONI et ZAFFIRO (I3) agglutinent des hématies humaines de groupe O avec les virus ECHO type 3, 7, I0, II, I2 et I9. Ils signalent des résultats inconstants pour le virus ECHO type 6, le virus Coxsackie B3 et aucune activité des virus ECHO type 20, 2I, 22, 23, 24. Par contre le pouvoir agglutinant de l'ECHO type I3 décrit par LAHELLE n'est pas retrouvé par DARDADONI et ZAFFIRO bien que leur

souche ait un haut titre infectieux (IO- 7,5) et soit neutralisée en culture de rein de singe par l'antisérum correspondant. Ces auteurs ont testé des hématies de poule, de cobaye, mouton, boeuf et lapin sans résultats.

PHILIPSON (45) avec des hématies humaines de groupe O obtient des résultats positifs avec les ECHO type 7, II, I8, I9, 20, 22 et 23.

BUSSELL, KARZON et HALL (6) signalent l'hémagglutination des ECHO type 6, 7, I2 par les hématies humaines O. Ils ont essayé d'agglutiner des hématies de mouton, de poulet (adulte et embryon), de cobaye, de chien, de serpent et de caïman. Ils notent la possibilité d'obtenir avec les hématies de singe rhesus une agglutination par les ECHO type 7 et I2, agglutination dont ils démontrent la spécificité.

Résultats obtenus

Nous avons testé tous les virus ECHO que nous possédions ; types I à 29 (excepté ECHO type 2).

- Avec les hématies humaines de groupe O

Se sont révélés posséder une hémagglutinine les virus ECHO type 3, 6, 7, II, I2, I9 et 29. Nous avons constaté que la souche prototype d'ECHO type 3 MORRISEY que nous possédions au laboratoire se révélait non hémagglutinante, alors que le même prototype que nous faisait parvenir le Professeur DARDANONI avait un titre hémagglutinant de 256. Aucun des auteurs cités précédemment n'avait constaté une variation du pouvoir hémagglutinant du virus ECHO type 3.

Pour le virus ECHO type 6, nous avons retrouvé la particularité décrite par LAHELLE pour ce groupe : la souche 6" BURGESS, entre nos mains, se révélait hémagglutinante, alors que la souche 6' DI MEO et le prototype 6 d'AMORI ne l'étaient pas. Huit souches de type 6, isolées au laboratoire, étaient douées de pouvoir agglutinant.

Le virus ECHO type 7, prototype WALLACE et une souche isolée au laboratoire étaient positives. Nous n'avons pas constaté de variations dans le pouvoir hémagglutinant des virus :

ECHO type II : souche GREGORY et une souche isolée au laboratoire

ECHO type I2 : prototype TRAVIS

ECHO Type I9 : prototype BURKE et 6 souches isolées au laboratoire

Le virus ECHO type 29, non encore entré officiellement dans le cadre des virus ECHO, se révélait faiblement agglutinant.

Nous résumons dans le tableau 2 les différents résultats trouvés :

	3	6	7	I0	II	I2	I3	I8	I9	20	22	23
GOLDFIELD et coll.	+	+	+	+	+	+	0	NF	NF	NF	NF	NF
LAHELLE	+	±	+	0	+		+	NF	NF	NF	NF	NF
DARDANONI ZAFFIRO	+	±	+	+	+	+	0	0	+	0	0	0
PHILIPSON			+		+			+	+	+	+	+
BUSSELL KARSON et HALL		±	+			+						
Nos résultats	±	±	+	±	+	+	—	—	+	—	—	—

Tableau nº 2 -

NF : non faits
± : résultats variables selon les souches d'un même type

- Avec les hématies de singe

Le bilan ne s'avérait pas complètement négatif. En effet, avec les hématies de Cercopithecus patas, sur les 29 types essayés, 2 étaient capables d'agglutiner ces hématies, il s'agissait des types

7 et I2. Nous retrouvions là les résultats signalés par KARZON, BUSSELL et HALL, résultats que ces auteurs avaient obtenus avec des hématies de Macacus Rhesus. Avec les hématies de Cercopithecus aethiops (VERVET) nous obtenions un résultat positif avec les virus ECHO type 7 et I2 qui étaient donc capables d'agglutiner indifféremment les hématies humaines et les trois espèces de singe citées précédemment.

Un autre type, le virus ECHO type 4 était capable d'agglutiner les hématies de Cercopithecus Aethiops (VERVET), agglutination qui était inhibée par l'antisérum de singe correspondant (antisérum de la National Foundation for Infantile Paralysis).

Les résultats obtenus avec les 3 sortes d'hématies humaines de singes Patas et Vervet sont groupés dans le tableau nº 3.

	ECHO 3	ECHO 6	ECHO 7	ECHO II	ECHO I2	ECHO I9	ECHO 29	ECHO 4
Hématies humaines O	±	±	+	+	+	+	+	-
Hématies Patas	-	-	+	-	+	-	-	-
Hématies Vervet	-	-	+	-	+	-	+ faiblement	+

Tableau nº 3 -

Tous les types de virus ECHO de 1 à 29 (type 2 excepté) ont été testés avec les hématies de singe Cercopithecus aethiops (VERVET) à 4º et à 37º, à pH 7,3 - 7,4. Alors qu'à 4º les types 4, 7, I2 étaient hémagglutinants, à 37 º seul le type I2 conservait un pouvoir agglutinant d'ailleurs assez considérablement diminué, il passait du taux de positivité du I/I60ème à 4º au I/20ème à 37º.

Nous n'obtenions pas de résultats positifs avec les hématies de poulet et d'embryon de poulet. Nous avons également essayé d'agglutiner par les différents types de virus ECHO, des hématies de

poulets adultes capables d'être agglutinés par le virus vaccinal. En effet, le virus vaccinal peut agglutiner un certain pourcentage d'hématies de poulet prises au hasard. Ces lots d'hématies de poulet,qui ont la possibilité de fixer le virus vaccinal, possèdent un récepteur que n'ont pas les autres lots d'hématies, ce qui nous a fait envisager du fait de ce plus large potentiel de réception, la possibilité éventuelle de fixer certains virus ECHO. Pour cette expérience, des poulets adultes ont été saignés par ponction cardiaque, le sang étant recueilli sur la solution d'Alsever. Les hématies sont lavées comme habituellement et mises en suspension à 0,5 % en tampon phosphate. On effectue des dilutions en progression géométrique de raison 2 d'un antigène de vaccine préparé sur oeuf de poule embryonné, chaque tube recevant 0,5 ml de dilution de virus, et 0,5 ml de suspension de globules rouges à 0,5 %. La réaction s'effectue à la température du laboratoire, la lecture ayant lieu après 2 heures. Sur II lots d'hématies prélevées, 2 ont été agglutinées par le virus vaccinal. Ces 2 lots d'hématies ont été retenus pour être engagés dans une réaction d'hémagglutination avec les différentes souches de virus ECHO :

- Souches hémagglutinant les hématies humaines :
  Types 3, 6", 7, II, I2 et I9
- Souches non hémagglutinanates
  Types I, 5, 6, 6', 8, 9, I3, I4, I6.

Nous n'avons pas observé de résultat positif, la réaction s'effectuant dans les conditions habituelles à pH 7,3 et à 4º.

2 - Hématies trypsinées

Dans le but de révéler un récepteur d'hémagglutinine qui pourrait ne pas être décelé dans une réaction d'hémagglutination classique, nous avons trypsiné des hématies de différentes espèces. La technique de trypsination utilisée est la suivante :

On prépare une solution de trypsine (DIFCO I/250ème) : I mg de trypsine est dissout dans 5 ml eau physiologique à 8,5 g par litre de ClNa
5 ml solution tampon phosphate pH 8.

On obtient ainsi une solution au I/I0000ème. On ajoute à :

0,I ml de culot hématié

0,9 ml de solution à pH 8 de trypsine à I/I0000.

Le mélange est mis à incuber 30 minutes au bain marie à 37º. Les hématies sont centrifugées, lavées une fois en eau physiologique, le culot est repris dans I0 ml d'eau physiologique, on obtient ainsi une suspension à I %. Nous avons ainsi trypsiné :

- des hématies humaines
- des hématies d'Erythrocebus patas
- des hématies de Cercopithecus aethiops
- des hématies de mouton.

A - Avec les hématies humaines

Tous les types de virus ECHO que nous avions trouvé hémagglutinant les hématies humaines normales, agglutinent les hématies humaines trypsinées. Il s'agit des types 3, 6", 7, II, I2, I9 et 29 (faiblement). Deux autres types de virus ECHO, après trypsination des hématies O, deviennent capables de les agglutiner : il s'agit des ECHO types I et 20. Le sédiment, même si la lecture est faite, dans les délais normaux de 3 heures, a l'aspect d'une agglutination à 4 croix dont la lecture n'aurait pas été faite avant plusieurs heures, les bords de la pastille d'hématie étant assez peu déformés et pouvant être confondus avec una agglutination douteuse. Si on remet en suspension les hématies et si l'on effectue une lecture très précoce, après I heure et demie seulement de sédimentation, on voit qu'il s'agit bien d'une hémagglutination positive pouvant être lue à trois croix.

B - Hématies d'Erythrocebus patas trypsinées

Les résultats sont comparables à ceux obtenus avec les hématies non traitées : 2 types agglutinent, il s'agit des ECHO type 7 et I2.

C - Hématies de Cercopithecus aethiops (VERVET) trypsinées

La trypsination supprime l'hémagglutination obtenue avec l'ECHO type 4, mais laisse persister celle provoquée par les types 7 et I2.

D - Hématies de mouton trypsinées

Tous les types de I à 29 (2 excepté) ont été engagés dans la réaction effectuée à 37º et à 4º. Aucun résultat n'a été noté.

PELON, MOGABGAB, PHILLIPS, PIERCE (43) isolent en I960 le virus 2060 devenu depuis l'ECHO type 28, du lavage du nasopharynx de sujets présentant une affection respiratoire bégnine. Ils essaient différentes méthodes pour provoquer par ce virus l'hémagglutination des hématies humaines O, de poule, de singe Rhesus, de mouton, de lapin. Ils utilisent des suspensions de globules rouges en dextrose à 0,25 M, ils chauffent l'antigène à 70º, I0 minutes. Ils chauffent l'antigène suivi de centrifugation I2000 tours, 30 minutes. Ils utilisent des hématies trypsinées avec une suspension de trypsine à 0,I % pendant I heure avec les hématies O, de poule et singe trypsinées, une agglutination par le virus 2060 à des taux variant de 64 à I28.

Nous n'avons pas retrouvé ces résultats, en trypsinant des hématies engagées dans une réaction avec l'ECHO type 28. Nous avons utilisé une solution de trypsine à I/I0000, alors que les auteurs précédents utilisaient une trypsine à I/I000, ce qui peut expliquer la divergence de nos résultats.

II - /Etude du récepteur du virus ECHO de l'hématie humaine/

Faits publiés

GOLDFIELD (I8) étudiant la liaison hématie-hémagglutinine montre que l'hémagglutinine peut être éluée du globule rouge qui devient alors inagglutinable par un virus homologue. Il différencie le récepteur de virus ECHO sur l'hématie de celui du virus grippal car les hématies O traitées par le réceptor destroying enzym restent capables de fixer l'hémagglutinine des virus ECHO.

TABLEAU RECAPITULANT LES HEMATIES UTILISEES DANS LES REACTIONS D'HEMAGGLUTINATION ET LES RESULTATS OBTENUS

VIRUS ECHO	GR O	GR O tr.	GR patas	GR patas tr.	GR Vervet	GR Vervet tr.	GR E.P.	GR poulet+ en vaccine	GR mouton tr.
E I	-	+	-	-	-	-	-	-	-
E3 MD	+	+	-	-	-	-	-	-	-
(º)ML	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 4	-	-	-	-	+	-	-	-	-
E 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E6-6'	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6"	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E 7	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E II	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E I2	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E I3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E I4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E I5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E I6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E I7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E I8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E I9	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E 20	-	+	-	-	-	-	-	-	-
E 2I	-	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
E 22	-	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
E 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 24	-	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
E 25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 27	-	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
E 28	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E 29	+	±	-	-	-	-	-	-	-

(º) - E 3 MD : souche prototype 3 Morrisey envoyée par le Pr DARDANONI
ML : souche prototype 3 du laboratoire

NF : non fait
tr.: trypsinées
E.P.: embryon de poulet

LAHELLE (33, 34) étudie l'association particule virale - hémagglutinine, en même temps qu'il y a adsorption de l'hémagglutinine sur l'hématie, il y a également adsorption de la particule virale : en effet, après hémagglutination par l'ECHO type 6, le titre hémagglutinant du surnageant devient nul, le titre infectieux est lui, très diminué. Il donne les chiffres suivants :

- le titre hémagglutinant de 32 U HA devient inférieur à 2 U
- le titre infectieux de $IO^{7,5}$ devient $IO^{5,8}$ DICT 50

la même expérience sur la souche prototype 6 d'AMORI montre que la souche n'hémagglutinant pas, le pouvoir infectieux ne varie presque pas : de $IO^{7,5}$, il devient $IO^{7,2}$.

PHILIPSON (45) étudie l'effet de différentes préparations enzymatiques d'activité protéolytique et phospholipasique sur l'hématie. Il utilise : chymotrypsine, trypsine, élastase, phospholipase A et constate que seule la chymotrypsine est capable de modifier l'hématie de façon à la rendre inagglutinable par les virus ECHO qui l'agglutine normalement. Aucun des autres enzymes utilisés n'a d'activité. PHILIPSON pense qu'il s'agit d'une adsorption de l'enzyme sur l'hématie bloquant la récepteur de virus d'une façon spécifique: en effet, la destruction de la chymotrypsine par le di-isofluorophosphate supprime l'action de l'enzyme sur les globules rouges.

Deux virus trouvés hémagglutinants par PHILIPSON, E_{I8} et E_7 sont engagés dans une réaction d'hémagglutination, après que les hématies aient été traitées par la chymotrypsine à la concentration de 1 mg/ml. Après avoir mis en contact le liquide viral et les hématies chymotrypsinées, il réalise la séparation : tout le surnageant contient encore l'hémagglutinine, la chymotrypsine a donc inhibé sa fixation sur l'hématie.

PHILIPSON suggère que la chymotrypsine détruit le récepteur de l'hématie pour l'agglutinine des virus ECHO par un effet enzymatique.

Le fait que la fixation de l'hémagglutinine soit impossible sur l'hématie lorsque celle-ci a été traitée par la chymotrypsine fait penser à PHILIPSON qu'il y a une substance spécifique sur l'hématie humaine qui provoque la fixation du virus ECHO et que par hydrolyse de cette substance, l'adsorption du virus sur l'hématie devient impossible. Il pense que la chymotrypsine a un effet destructeur du récepteur, agissant selon un mécanisme comparable à celui du RDE vis à vis des myxovirus.

Résultats obtenus

Notre travail sur l'étude du récepteur de virus ECHO sur l'hématie a cherché à préciser trois points :

A - L'hématie ayant fixé un virus ECHO, après élution, est-elle capable de fixer un virus homologue, problème déjà envisagé par GOLDFIELD ?

B - L'hématie ayant fixé un virus ECHO peut-elle fixer un autre type de virus ECHO ?

C - Le traitement de l'hématie par un virus ECHO non hémagglutinant peut-il modifier le récepteur pour un ECHO agglutinant ?

A - L'hématie ayant fixé un virus ECHO l'ayant élué, peut-elle fixer à nouveau un virus homologue ?

Nous avons réalisé une hémagglutination classique avec un ECHO type 7. Chaque tube reçoit 0,5 ml dilution virus
0,5 ml tampon phosphate pH 7,3
0,5 ml suspension hématie 0,5 %

La réaction est laissée 3 heures à + 4º et lue = réaction I. On centrifuge alors les IO tubes de la réaction IO minutes, 3000 tours et on élimine le surnageant. Les hématies sont remises en suspension dans 0,5 ml tampon pH 8,4, la réaction est laissée 2 heures à 37 º : nous avons en effet observé que l'ECHO type 7 à pH 8,4 et à 37º devient incapable d'agglutiner les hématies O : c'est la phase d'élution de la réaction.

Après 2 heures, on décante et on élimine le surnageant. Le culot globulaire présent dans chaque tube est remis en suspension dans 1 ml de solution tampon pH 7,3 et divisé en deux parties :

- 0,5 ml sont distribués dans IO tubes et reçoivent 0,5 ml de tampon phosphate pH 7,3 : ils vont nous permettre de contrôler que l'élution s'est bien effectuée dans la phase précédente de la réaction, s'il n'y a plus d'hémagglutination = réaction 2.
- à 0,5 ml de suspension globulaire restant dans les IO autres tubes sont ajoutés 0,5 ml d'une dilution du même ECHO type 7 contenant 8 unités hémagglutinantes. C'est la réaction 3.

Les réactions 2 et 3 sont lues après 3 heures d'incubation à 4º.

Dilution virus	$\frac{I}{2}$	$\frac{I}{4}$	$\frac{I}{8}$	$\frac{I}{16}$	$\frac{I}{32}$	$\frac{I}{64}$	$\frac{I}{128}$	$\frac{I}{256}$	$\frac{I}{512}$	$\frac{I}{1024}$
Réaction I HA par ECHO 7	3	3	3	3	3	3	3	2+	0	0
Réaction 2 après élution du virus	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Réaction 3 après nouveau contact avec ECHO 7 (8 U HA)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Tableau nº I

le chiffre 3 correspond à une lecture à +++
HA : hémagglutination

Les résultats trouvés nous montrent, dans la réaction 2, plus d'hémagglutination sinon dans le tube dilué au demi, l'élution de l'hémagglutinine a donc été effectuée.

La réaction 3 montre que les globules rouges sont à nouveau capables de fixer un ECHO type 7 après l'avoir élué : résultats discordants avec ceux de GOLDFIELD qui donne l'hématie incapable de fixer à nouveau un virus qui a été fixé, puis élué.

B - L'hématie ayant fixé un virus ECHO peut-elle fixer un autre type de virus ECHO ?

Pour étudier ce point, nous avons suivi un protocole peu différent du précédent.

Les réactions I et 2 sont effectuées dans les mêmes conditions que précédemment.

La réaction I réalise l'hémagglutination d'une suspension d'hématies à 0,5 % par un ECHO type 7.

La réaction 2 effectue l'élution du virus à 37º et pH 8,4.

La réaction 3 vérifie que les surnageants de la réaction 2, contiennent à nouveau le virus de type 7 élué.

La réaction 4 consiste à remettre les hématies en suspension en tampon pH 7,3 et à ajouter 8 unités hémagglutinantes d'ECHO type II : 0,5 ml par tube.

La lecture s'effectue après 3 heures à 4º.

Les résultats sont notés dans le tableau nº 2.

	$\frac{I}{2}$	$\frac{I}{4}$	$\frac{I}{8}$	$\frac{I}{16}$	$\frac{I}{32}$	$\frac{I}{64}$	$\frac{I}{128}$	$\frac{I}{256}$	$\frac{I}{512}$	$\frac{I}{1024}$
Réaction I : HA classique ECHO 7	3	3	3	3	3	3	3	2+	0	0
Hématies après élution : réaction 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Surnageant après élution + GR non traités;réaction 3	3	3	3	3	3	3	2	0	0	0
Hématies après élution + 8 U HA ECHO II : réaction 4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Tableau nº 2 -

Les hématies O ayant fixé le virus ECHO type 7, après élution de ce type 7, conservent la propriété de fixer non seulement un virus homologue mais aussi un virus hétérologue.

C - Le traitement de l'hématie par un virus ECHO non hémagglutinant peut-il modifier le récepteur pour un ECHO agglutinant ?

Pour cette étude, nous avons mis en contact à 4º, 3 heures :

5 ml suspension hématies O à 0,5 %

5 ml ECHO type 5 dilué au I/5 (liquide titrant $IO^{-6,83}$ DICT 50)

Après 3 heures, nous avons centrifugé 3000 tours pendant IO minutes et décanté le surnageant.

Le culot globulaire est remis en suspension dans 5 ml x tampon et réparti dans IO tubes sous volume de 0,5 ml, les tubes contenant au préalable 0,5 ml de dilutions de virus ECHO type 7.

	$\frac{I}{2}$	$\frac{I}{4}$	$\frac{I}{8}$	$\frac{I}{16}$	$\frac{I}{32}$	$\frac{I}{64}$	$\frac{I}{128}$	$\frac{I}{256}$	$\frac{I}{512}$	$\frac{I}{1024}$
Réaction avec GR traités par ECHO 5 + ECHO 7	3	3	3	3	3	3	2+	2	±	0
Réaction avec GR non traités + ECHO 7	4	3	3	3	3	3	2+	2+	±	0

Tableau nº 3 -

Il ne semble pas y avoir de modification du récepteur de l'hématie pour les virus ECHO hémagglutinants lorsque l'hématie est au préalable traitée avec un ECHO de type 5 non hémagglutinant. Ceci d'ailleurs concorde avec les résultats obtenus par LAHELLE qui montrent qu'un ECHO type 6 hémagglutinant voit, au cours de l'hémagglutination, se fixer sur l'hématie à la fois l'hémagglutinine et la particule

virale alors qu'un ECHO type 6 non hémagglutinant conserve le même titre infectieux avant et après contact avec l'hématie et ne se fixe donc pas sur l'hématie.

En résumé, les connaissances actuelles sur la nature du récepteur et le mécanisme de l'hémagglutination par les virus ECHO sont encore très limitées, des travaux ultérieurs devront préciser ces notions. Un point semble acquis, tous les auteurs sont d'accord, il s'agit d'un récepteur de nature différente de celui du virus grippal. Le mécanisme, d'après PHILIPSON, semble être la fixation du virus ECHO par un récepteur de virus ECHO spécifique, capable d'être détruit par réaction enzymatique.

Nos expériences, limitées il est vrai sur ce point, et demandant de plus amples développements, nous conduiraient à penser que la liaison récepteur - virus n'entraine pas une altération définitive du récepteur, mais qu'il s'agit d'une liaison réversible, pouvant être rompue sans altérer ni le récepteur, ni le virus.

Le fait démontré par PHILIPSON que le récepteur soit inactivé par la chymotrypsine oriente vers la structure protéique de ce récepteur.

III -/Etude des facteurs pouvant modifier l'hémagglutination/

1 - Influence de la température et du pH sur l'hémagglutination des virus ECHO

Faits publiés

GOLDFIELD (I7) étudiant l'activité hémagglutinante des virus ECHO pour les hématies humaines en fonction de la température, n'observe pas de différences importantes entre les réactions à 8 et à 25º, mais d'après les titres obtenus à 37º, classe les virus en deux groupes :

- ECHO type 7, I0, I2 dont le titre ne varie pas,

- ECHO type 3, 6, II dont le taux est très abaissé.

Ces résultats sont notés pour les souches prototypes et pour de nombreuses souches isolées.

LAHELLE (33) obtient des résultats à peu près équivalents :

- ECHO type 3, II, I3 donnent le plus haut titre à 4º, à 20º des taux plus bas et pas d'agglutination à 37º.

- l'ECHO type 7 a des taux équivalents aux 3 températures,

- l'ECHO type I9 donne des titres plus bas à 37º qu'à 4º et à la température du laboratoire.

D'après LAHELLE, la majorité des souches ayant comme température optima 4º, cette température est celle à choisir pour les réactions, les souches dont l'optimum n'est pas à + 4º hémagglutinant cependant à cette température. LAHELLE résume ses résultats en un tableau I.

	4º	20º	37º
ECHO type 3	Topt	+	0
ECHO type 6	+	+	Topt
ECHO type 7	+	+	+
ECHO type II	Topt	+ faible	0
Echo type I3	Topt	+ faible	0
ECHO type I9	Topt	Topt	+

Tableau nº I

Topt : température optimum

Résultats obtenus

Nous avons réalisé une étude de l'influence concommitante du pH et de la température sur l'hémagglutination par les virus ECHO.

Pour ce faire, nous avons utilisé les solutions tampons phosphate de pH 5,9 à 7,73, réalisées à partir des solutions mères de tampon phosphates :

PO_4Na_2H, 2 H_2O à 54,13 ‰

PO_4H_2K à 22 ‰

de pH 7,8 à 8,8, nous utilisions des solutions tampons borate.

Tous les pH étaient contrôlés au pHmètre (Taccussel). Les dilutions de virus s'effectuaient dans la solution dont on étudiait le pH, les dilutions étant faites en triple, une réaction s'effectuant à 4º, une à 20º, une à 37º.

De même la suspension de globules rouges O, après 3 lavages en eau physiologique s'effectuait dans la solution dont on étudiait le pH.

Nous avons réalisé cette étude sur tous les types de virus ECHO hémagglutinants que nous possédions, c'est-à-dire :

ECHO type 3
ECHO type 6"
ECHO type 7
ECHO type II
ECHO type I2
ECHO type I9
ECHO type 29

- ECHO type 3

L'examen des résultats trouvés pour le type 3 montre que la température optima est à + 4º, les réactions à 20º étant toujours inférieures à celles trouvées à 4º, les réactions à 37º étant négatives.

L'ECHO type 3 hémagglutine mieux à des pH alcalins qu'à des pH acides, la zone la plus favorable étant située de pH 8 à pH 8,8.

ECHO t. 3	5,8	6,08	6,3I	6,49	6,67	6,8I	7	7,4	7,53	8	8,2	8,5	8,8	9
4º	64	I6	I28	256	I28	256	256	I28	I28	5I2	256	5I2	5I2	I28
20º	<I6	64	64	64	32	32	32	<I6	<I6	64	32	32	I6	<I6
37º	<I6	<I6	<I6	<I6	<I6	<I6	<I6	<I6	<I6	<I6	<I6	<I6	<I6	<I6

Tableau nº 2

Les chiffres donnés correspondent à l'inverse de la dilution contenant I unité hémagglutinante, les résultats seront désormais exprimés de cette manière.

- ECHO type 6"

L'ECHO type 6 est la souche de virus ECHO qui se montre la moins sensible aux variations de température et de pH. Elle agglutine aussi bien à 4º qu'à 20º et 37º, et nos essais ne nous ont pas permis de choisir une des 3 températures comme la meilleure. De même l'ECHO type 6 est actif dans une très large gamme de pH.

ECHO t. 6	5,8	6,08	6,3I	6,49	6,67	6,8I	7	7,2I	7,53	8	8,2	8,5	8,8	9
4º	5I2	I024	5I2	5I2	5I2	256	5I2	5I2	256	5I2	I024	5I2	256	I28
20º	5I2	5I2	5I2	5I2	5I2	256	5I2	5I2	5I2	I024	5I2	5I2	5I2	256
37º	I024	5I2	5I2	256	5I2	256	5I2	5I2	256	256	I28	64	32	0

Tableau nº 3

- ECHO type 7

Il hémagglutine aux 3 températures : 4º, 20º et 37º, les taux sont cependant plus élevés à 4º qu'à 20º et 37º.

Il est peu sensible aux variations de pH du milieu, on remarque qu'à partir de pH 8,2 et à 37º, il n'est plus hémagglutinant (propriété que nous avons utilisée au cours de nos essais d'élution).

ECHO t. 7	5,72	6,02	6,24	6,42	6,5	6,75	6,94	7,I6	7,46	7,96	8,2	8,4	8,6	8,75
4º	I28	256	I28	64	256	5I2	I28	I28	256	5I2	256	I28	64	I28
20º	I28	256	I28	256	I28	5I2	I28	I28	I28	5I2	64	I28	256	64
37º	I28	256	256	256	64	5I2	64	I28	256	5I2	0	0	0	0

Tableau nº 4

- ECHO type II

Il n'hémagglutine pas à la température de 37º et il est peu sensible aux variations de pH du milieu.

ECHO t.II	5,75	6,08	6,30	6,45	6,0I	6,80	6,90	7,I8	7,3	7,5	7,72	8,07	8,36	8,45
4º	32	32	32	64	64	I28	I28	64	32	64	64	64	32	32
20º	32	32	32	32	32	64	64	64	32	32	32	32	I6	I6
37º	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau nº 5

Il possède la particularité d'hémagglutiner à 20º, plus faiblement qu'à 4 º. Si la galerie d'hémagglutination est laissée à la température du laboratoire pendant I2 heures, il y a élution du virus.

- ECHO type I2

Il se comporte de la même manière que l'ECHO type 7 aussi bien par sa faible sensibilité aux variations de pH, aux variations de température que par son pouvoir d'agglutiner comme lui à la fois les hématies humaines, d'Erythrocebus patas et de Cercopithecus aethiops.

ECHO t.I2	5,8	6,08	6,3I	6,49	6,67	6,8I	7	7,2I	7,53	8	8,2	8,5	8,8	9
4º	2048	2048	I024	I024	I024	I024	4096	2048	I024	I024	I024	I024	2048	I024
20º	4096	4096	I024	I024	I024	I024	4096	4096	2048	4096	4096	4096	4096	4096
37º	4096	I024	I024	I024	I024	I024	I024	2048	I024	4096	2048	I024	5I2	5I2

Tableau nº 6

- ECHO type I9

Il ne donne pas d'hémagglutination à 37º dans les zones de pH utilisées habituellement dans les réactions, les résultats obtenus à 20º sont inférieurs à ceux obtenus à 4º. A cette température, la zone de pH acide est légèrement plus favorable que celle des pH neutres ou alcalins.

ECHO t.I9	5,8I	6,I2	6,34	6,46	6,66	6,78	6,93	7,26	7,43	7,73	8,03	8,32	8,4	8,7
	2560	2560	I280	2560	I280	640	I280	320	640	I280	I280	I280	640	320
	640	I280	640	640	320	320	320	I60	I60	640	640	320	I60	80
	I60	I00	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau nº 7

- ECHO type 29

Il a un optimum de température à 4º et de pH acide.

ECHO t.29	6,0I	6,24	6,42	6,58	6,74	6,95	7,I3	7,43	7,9	8,2	8,5	8,8	9
4º	2560	640	320	320	320	I60	80	I60	320	40	20	<20	<20
20º	640	I60	I60	80	80	I60	80	80	I60	40	40	40	<20
37º	I60	I60	80	40	40	20	20	20	20	40	40	<20	<20

Tableau nº 8

De cette étude de la sensibilité des différentes souches ECHO hémagglutinantes aux variations de pH et de température, on peut voir se dessiner différents groupes de virus ECHO :

1º/ - Les ECHO type 7 et I2 agglutinant aussi bien aux 3 températures et très peu sensibles aux variations de pH.
Ils appartiennent au groupe B de la classification de HSIUNG et MELNICK qui, avec l'ECHO type 8, les caractérisent par la culture à la fois sur cellules de reins de Rhesus et de Patas en donnant des plaques larges et circulaires.
Ils sont capables d'agglutiner indifféremment les hématies humaines et les hématies de singe (Patas et Vervet) à des titres moindres.

2º/ - Les ECHO type 3, II et I9 n'hémagglutinant pas à 37º, toujours favorisés par une température d'hémagglutination de 4º, appartenant au groupe A de HSIUNG et MELNICK (sauf le type I9 non décrit en I957 au moment de la publication de ces auteurs), caractérisés par la formation de plaques petites et irrégulières en culture de reins de Rhesus et son impossibilité de cultiver sur reins de Patas.

3º/ - L'ECHO type 6 est mis à part dans la classification de MELNICK, car cultivant sur cellules de reins de Rhesus, ils ne donnent pas la formation de plaques.
Les avis sont différents sur la sensibilité de l'ECHO type 6 à la température, GOLDFIELD donne la température de 37º comme diminuant de façon importante l'hémagglutination par le type 6, LAHELLE indique la température optima.

Nos essais avec la souche 6" BURGESS nous ont montré comme équivalentes les deux températures de 4º et 37º.

2 - Influence du milieu utilisé pour les cultures de tissu, sur la production de l'hémagglutinine

Les milieux utilisés pour la production de l'hémagglutinine varient selon les auteurs :

GOLDFIELD (I8) utilise 0,5 % hydrolysat de lactalbumine en solution de Hanks.

LAHELLE (33,34) travaillant sur cellules amniotiques humaines, emploie du liquide amniotique de bovidé + 2 % de sérum de veau.

DARDANONI et ZAFFIRO (II, I3) cultivent les virus ECHO sur cellules de reins de singe en présence d'hydrolysat de lactalbumine en solution de Earle.

KARZON (6) utilise un milieu à base de :

Hydrolysat lactalbumine	0,5 %	Albumine bovine	0,2 %
Yeast extract	0,I %	Solution de Earle	

PHILIPSON (45) emploie soit le liquide amniotique de bovidé, soit l'hydrolysat de lactalbumine en solution de Hanks.

Pour déterminer les conditions de développement les plus favorables à l'hémagglutinine, en culture de reins de singe, nous avons comparé différents milieux de culture dont nous faisions varier la composition et le pH.

Cet essai a été ainsi affectué :

Les tubes de reins de singe sont vidés de leur milieu et lavés avec la solution de HANKS.

Ils sont répartis par lots de I5 : 5 étant des tubes témoins, IO recevant chacun 0,I ml de virus ECHO de type 7 pur et 0,9 ml de milieu.

Nous avons ainsi 7 lots de tubes :

- le premier reçoit 0,9 ml de :
  Hydrolysat lactalbumine 0,5 % en solution de Hanks
  + 30 % de liquide amniotique de bovidés.
- le deuxième 0,9 ml de liquide amniotique de bovidés
- le troisième 0,9 ml de :
  Hydrolysat lactalbumine 0,5 % en solution Hanks à pH 7 (le pH est ajusté à l'aide d'une solution stérile de rouge de phénol à 0,04 %) + bicarbonate de soude à I,4 %.
- les 5ème, 6ème et 7ème reçoivent dans l'ordre :
  Hydrolysat lactalbumine 0,5 % en solution de Hanks à pH 7,2 - 7,4 - 7,6.

Les tubes sont placés à l'étuve à 35º jusqu'à dégénérescence complète. Tous les tubes d'un même lot, sauf les témoins, sont mélangés et on titre l'hémagglutinine sur une partie aliquote soit 0,5 ml.
Les résultats sont donnés dans le tableau 9.

	LACT + liquide amniotique	Liquide amniotique	LACT + sérum poulain	LACT pH 7	LACT pH 7,2	LACT pH 7,4	LACT pH 7,6
ECHO type 7	I28	I28	256	256	256	5I2	5I2

Tableau nº 9

Les variations ne sont pas très importantes d'un milieu à l'autre. Cependant le liquide amniotique ne semble pas favoriser le développement de l'hémagglutinine, qui l'est au contraire par un milieu contenant le seul hydrolysat de lactalbumine à pH suffisamment alcalin : 7,4 - 7,6.

L'effet dépresseur sur l'hémagglutinine attribué au liquide amniotique, est décrit par PHILIPSON (45) qui constate dans ce liquide la présence d'inhibiteurs de l'hémagglutination. Il réalise des galeries en utilisant comme diluant de l'eau physiologique et parallèlement du liquide amniotique et constate dans les galeries contenant du liquide amniotique une diminution du titre hémagglutinant.

Cette inhibition est variable selon les lots de liquide amniotique. Le chauffage à 100º augmente son activité inhibante. Une dialyse de 12 heures contre de l'eau physiologique ne la modifie pas alors que la filtration sur Seitz la diminue beaucoup et que le traitement à la bentonite la supprime. Il s'agit très probablement d'inhibiteurs de nature lipoprotéique comparable à ceux que nous avons trouvés dans les sérums, inhibiteurs qui peuvent être supprimés soit par traitement à la bentonite, soit par traitement au kaolin.

IV - /Etude des modalités d'obtention des hémagglutinines/

I - Influence des modalités d'inoculation de la suspension virulente sur la production de l'hémagglutinine en culture de tissu

Après avoir étudié quel était le milieu à choisir pour avoir en culture de tissus la plus grande production possible d'hémagglutinine, nous avons cherché à déterminer quelle quantité de virus nous devions inoculer aux tubes de culture de reins de singe pour nous trouver dans les conditions optima.

Nous avons effectué cette étude avec une souche ECHO type 7, la souche prototype WALLACE.

Pour ce faire, les tubes de reins de singe étaient lavés une fois en solution de Hanks, puis recevaient 0,9 ml du milieu dont nous avions déterminé la meilleure activité dans l'expérience précédente.

Des lots de 5 tubes recevaient successivement 0,I ml de virus pur, puis dilué à IO^{-I}, IO^{-2}, IO^{-3} jusqu'à IO^{-6}. Les tubes étaient placés à l'étuve à 35º.

Chaque jour, une lecture était faite et au fur et à mesure de leur dégénérescence, les tubes étaient congelés. On effectuait ensuite le titrage de leur pouvoir hémagglutinant selon la technique classique : les tubes recevaient 0,5 ml de suspension d'hématies O à 0,5 %. On lisait après 3 heures d'incubation à 4º.

Des essais parallèles étaient effectués sur des prélèvements contenant à la fois les cellules et le liquide surnageant et sur des prélèvements du seul liquide surnageant après séparation des cellules par centrifugation 3500 tours, 20 minutes.

La lecture de la réaction montrait que les tubes contenant le virus à la plus grande dilution étaient ceux qui possédaient le plus haut titre hémagglutinant.

Les essais parallèles avec ou sans élimination des cellules montraient que lorsqu'on conservait les cellules, le taux d'hémagglutination était en général supérieur. Voici à titre d'exemple une de nos expériences :

	TITRES HEMAGGLUTINANTS	
	Cellules + surnageant	Surnageant
ECHO type 7 pur	I28	I28
IO-I	I28	5I2
IO-2	256	256
IO-3	256	I28
IO-4	5I2	256
IO-5	5I2	I28
IO-6	5I2	5I2

Dans le but de voir s'il pouvait y avoir dissociation complète entre le pouvoir hémagglutinant et le pouvoir infectieux, lorsqu'à une dilution comme 10^{-6} par exemple, on avait 2 tubes dégénérés et 3 non dégénérés, on testait d'une part le pouvoir hémagglutinant des tubes dégénérés que l'on trouvait être maxima et celui des tubes non dégénérés que l'on trouvait être nul. Il n'y avait donc pas de dissociation complète entre le titre infectieux et le titre hémagglutinant.

Un autre essai comparable était effectué avec une souche ECHO type II avec des résultats semblables. Ce type d'ECHO type II avait pur un titre hémagglutinant de 64, après dilution à 10^{-5} en culture de reins de singe il titrait 256 et après dilution à 10^{-6} il titrait 512.

Cette étude nous conduisait à essayer dans les mêmes conditions les types de virus ECHO chez lesquels nous n'avions pas trouvé d'hémagglutinine, la dilution en culture de tissus pouvant révéler une hémagglutinine jusque là trop faible pour être décelée.

Nos essais ont porté sur les types I, 5, 8, 9, 13, 14, 16 sans résultats positifs.

2 - Etude de l'apparition de l'hémagglutinine en culture de reins de singe

Nous avons également réalisé cette étude avec la souche d'ECHO type 7 prototype WALLACE.

Les tubes de reins de singe étaient lavés avec la solution de Hanks, puis recevaient 0,9 ml de milieu.

Ils étaient alors inoculés avec des doses décroissantes de virus 0,1 ml de virus pur, dilué à 10^{-1}, 10^{-2} etc.. jusqu'à 10^{-6}.

Les tubes étaient placés à l'étuve à 35º.

Après dégénéreseence complète des cellules, un certain nombre de tubes était congelé, les autres restant à 35º. On congelait ensuite successivement de 24 en 24 heures de façon à avoir des liquides cellulaires demeurés à l'étuve, I jour, 2 jours, 3 jours après la dégénérescence des cellules.

On constate alors que l'incubation prolongée ne nuit pas à l'hémagglutinine mais qu'au contraire elle continue à s'accumuler dans le milieu après la dégénéresence des cellules (tableau IO).

ECHO type 7	pur	IO^{-I}	IO^{-2}	IO^{-3}	IO^{-4}	IO^{-5}	IO^{-6}
Jour O : dégénérescence complète	I28	I28	256	256	5I2	5I2	5I2
Jour + I	I28	256	256	256	5I2	256	5I2
Jour + 2	I28	256	256	256	256	256	5I2
Jour + 3	5I2	256	256	256	5I2	5I2	I024

Tableau nº IO

Ce fait avait déjà été noté par LAHELLE (34) dans son étude sur l'hémagglutination d'ECHO type 6.

Il fait une étude parallèle du titre infectieux et du titre hémagglutinant sur des tubes inoculés avec environ IOO ID 50 par tube. Il remarque que le titre infectieux maximum au moment de la dégénérescence complète des tubes, baisse ensuite si les tubes sont maintenus à l'étuve alors que le titre hémagglutinant reste constant à partir du 3ème jour.

BUSSELL, KARZON et HALL (6) effectuent une étude comparable de la relation : titre infectieux - titre hémagglutinant.

Ils inoculent plusieurs boites de reins de singe avec environ I00 ID 50 par ml de 2 souches d'ECHO type 6.

Les résultats obtenus montrent que :

- le titre infectieux maximum est obtenu le 3ème jour,
- le titre hémagglutinant, dans un cas est maximum le 3ème jour puis reste constant jusqu'au I4ème jour alors que le titre infectieux baisse, dans l'autre cas le titre hémagglutinant augmente constamment jusqu'au I4ème jour.

Ceci peut s'expliquer par la relative thermostabilité de l'hémagglutinine qui est conservée à 37º sans altération alors que le DICT 50 à cette température s'abaisse rapidement.

3 - Méthode proposée pour la production de l'hémagglutinine

De la triple constatation, que l'hémagglutinine avait toujours un titre hémagglutinant plus élevé dans les liquides cellulaires que dans le seul surnageant, que l'hémagglutinine avait tendance à se concentrer dans le milieu après dégénéreseence des cellules et que, d'autre part, son activité pour la plupart des types de virus ECHO était optima à + 4º, nous avons pensé à tester en hémagglutination les antigènes tels qu'ils étaient préparés jusque là pour les réactions de fixation du complément.

Ces antigènes sont ainsi obtenus :

Des boîtes de Roux de reins de singe reçoivent 80 ml de milieu :

- Solution de Hanks contenant 0,5 % hydrolysat lactalbumine
- Liquide amniotique de bovidé 30 %
- Solution de rouge de phénol à 0,04 % et bicarbonate de soude I,4 %
- Antibiotiques : Pénicilline I00 u/ml
  Streptomycine 50 γ/ml

Les boites reçoivent alors des doses de virus telles que la dégénérescence des cellules ait lieu en 48 à 72 heures, et sont placées à l'étuve à 35º.

Lorsque la dégénérescence a eu lieu, on centrifuge le contenu de chaque boite, 3500 tours pendant 20 minutes, le culot cellulaire est séparé du surnageant et repris dans un volume IO fois moindre du surnageant : dans 8 ml (le reste du surnageant est utilisé pour des immunisations d'animaux).

Le culot cellulaire est laissé 7 jours à 4º, puis réparti et congelé à - 20º.

On titre alors l'hémagglutinine de la suspension cellulaire, les résultats obtenus montrent une concentration de l'hémagglutinine, qui dans presque tous les cas est au moins égale à dix fois celle que l'on avait au départ, dans le liquide surnageant correspondant (tableau II).

C'est la technique qui donnait les meilleurs résultats dans la production de l'hémagglutinine, nous l'avons donc adoptée.

	Surnageant	Culot cellulaire
ECHO T 3	64	I024
ECHO T 6"	I28	4096
ECHO T 7	64	I024
ECHO T I2	I024	4096
ECHO T I9		
ECHO T 29	I6	I28

Tableau nº II

Dans la méthode que nous avons décrite, le milieu de culture contenait du liquide amniotique, ces préparations étant primitivement destinées à l'obtention d'antigènes fixateurs du complément.
Il semble préférable de la supprimer lorsqu'on désire obtenir une hémagglutinine, prévenant ainsi l'existence possible dans ce liquide d'inhibiteurs.

V - /Essai de concentration de l'hémagglutinine/

GOLDFIELD (I8) a décrit l'hémagglutinine des virus ECHO comme sédimentable par ultracentrifugation. Ce sont les seuls travaux, à notre connaissance, qui aient étudié ce point précis.

Nous avons pu vérifier cette donnée, en même temps que nous obtenions par ce procédé, une concentration très importante de l'hémagglutinine.

Le protocole de l'expérience a été le suivant :

2 ml de virus ECHO type 7 (DICT 50 IO^7) étaient inoculés à une boite de Roux de cellules de reins de singe. Après dégénérescence des cellules (en 3 jours) on centrifuge 3500 tours pendant 20 minutes sur centrifugeuse de type Jouan pour séparer les cellules qui sont éliminées, on conserve le surnageant.

Le liquide viral est alors centrifugé sous volume de 20 ml sur une centrifugeuse de type Martin Christ 40000 tours pendant 2 heures (º). On obtient un culot de volume réduit, qui après élimination du surnageant, est repris dans un volume dix fois moindre, c'est-à-dire 2 ml de solution de Hanks.

On titre en hémagglutination le liquide viral :

- avant centrifugation sur centrifugeuse Martin Christ : Il titre 256.
- après centrifugation, on titre à la fois le culot et le surnageant ; le culot a un titre de I6384, le surnageant ne contenant pas d'hémagglutinine (Tableau I2).

(º) - Nous remercions Mademoiselle Y. CHARDONNET dont la compétence technique nous fut d'un grand secours dans nos problèmes de centrifugation.

	Avant centrifugation	Après centrifugation culot	surnageant
ECHO t. 7	256	I6384	8

Tableau nº I2

Nous avons donc là un moyen de concentration très important de l'hémagglutinine.

Il serait intéressant de centrifuger de la même manière, les virus ECHO non hémagglutinants de manière à tenter de révéler une hémagglutinine qui, dans les conditions habituelles, ne serait peut-être pas décelable.

VI - /Labilité des hémagglutinines de certains virus ECHO/

Problème de la variation selon les souches de la production de l'hémagglutinine.

Dès les premiers travaux sur l'hémagglutination par les virus ECHO, furent notées des divergences quant aux types déclarés hémagglutinants.

GOLDFIELD (I8) en I957 décrit comme hémagglutinants les types 3, 6, 7, IO, II et I2, ayant observé cette propriété sur de nombreuses souches isolées en cellules de reins de singe. Pour aucun de ces types, il ne signale d'exception.

LAHELLE (33) en I958, attribue à l'ECHO type 6 d'inconstantes propriétés hémagglutinantes : sur 5I souches de type 6 isolées de malades atteints de méningite aseptique, il en trouve I4 hémagglutinantes. Cette particularité n'est pas retrouvée pour les autres types: ECHO type 3, 7, II, I3 et I9.

ZAFFIRO et DARDANONI (II) retrouvent les variations dans l'hémagglutination des différentes souches d'ECHO type 6 qu'ils attribuent à une hétérogénéité antigénique.
Ils retrouvent les agglutinines pour les autres types décrites par LAHELLE sauf pour l'ECHO type I3, malgré une DICT 50 de $IO^{-7,5}$.

PHILIPSON (45) décrit 3 types hémagglutinants cités par les auteurs précédents : 7, II et I9 mais signale 4 types : E I8, 20, 22 et 23 qui jusque la n'avaient jamais été trouvés hémagglutinants.

Mac INTOSH et SOMMERVILLE notent que, sur 24 souches d'ECHO type 7 isolées dans la région de Glasgow, 8 seulement sont capables d'agglutiner les hématies humaines O.

KARZON, BUSSELL et HALL (6), dans une étude sur l'ECHO type 6 signalent 9 souches sur 24 hémagglutinantes, parmi les I5 qui ne le sont pas se trouve la souche prototype d'AMORI.

Nous-mêmes avons observé au sujet de la souche prototype 3 MORRISEY une curieuse divergence : la souche prototype 3, que nous faisait parvenir le Docteur NUNEZ MONTIEL, était non hémagglutinante: elle avait subi avant de nous parvenir II passages, les 5 derniers étant ainsi répartis : Décembre I958 - Avril I959 - Novembre I959 - Décembre I959 - Janvier I960.

Cette souche était cultivée sur cellules de reins de singe (Macacus rhesus), avant de nous être envoyée.

A sa réception elle fut cultivée sur cellules de reins de singe (babouin) en présence du milieu : hydrolysat de lactalbumine 0,5 % en solution de Hanks + 30 % de liquide amniotique.

Les liquides cellulaires se révélèrent non hémagglutinants.

Une autre souche ECHO type 3 MORRISEY qui nous qui nous était envoyée par le Professeur DARDANONI, cultivée par nous de la même manière, était hémagglutinante.

Devant cette dissociation du pouvoir hémagglutinant pour une même souche, nous avons essayé de trouver une explication dans leurs différents "curriculum vitæ" avant de nous parvenir.

Ne possédant pas les différents passages qu'avaient subis les 2 souches au cours de leur culture, nous n'avons pu les étudier directement. Aussi avons-nous réalisé sur d'autres types, l'étude des différents facteurs ayant pu varier pour chacune d'elles et avons essayé d'établir un parallèle.

On peut, en effet, envisagér l'influence :

- d'un temps de stockage variable
- d'un nombre de passages différents
- de méthodes de cultures utilisant soit des cellules, soit des milieux différents.

1 - Temps de stockage variable

Nous avons pu observer sur 4 souches que l'influence du temps de stockage n'est pas sans importance.

Ces 4 souches : II64 - I644 - I7I8 - I7I9, en Mars I96I possédaient un pouvoir hémagglutinant supérieur ou égal à I/32ème. A ce moment là, ces souches n'étaient pas identifiées.

En Février I962, lorsque nous avons voulu les typer, elles avaient perdu leur hémagglutinine.

Deux de ces souches : II64 et I644 étaient également incapables de dégénérer sur cellules de reins de singe.

On pouvait, pour elles, incriminer le vieillissement qui leur avait fait perdre simultanément leurs pouvoirs hémagglutinants et infectieux.

Les deux autres souches : I7I8 et I7I9 avaient conservé leur pouvoir infectieux et perdu leur pouvoir hémagglutinant, après un temps de stockage à - 20º de II mois.

2 - Influence du nombre de passage en cultures de tissu

Notre travail a porté sur les ECHO type 6, 7, et II : la stabilité de l'hémagglutinine au cours de plusieurs passages en cultures de tissus se révèle différentes selon les types.

Dans un premier temps, nous avons suivi le taux d'hémagglutination des types 7 et II, au cours de passages successifs sur cellules de reins de singe.

Pour l'ECHO type 7, au cours de 5 passages réalisés en Novembre, Décembre I960, Janvier, Février et Mars I96I, il n'y a pas eu de variations notables du titre hémagglutinant dans les différents liquides viraux.

Le même résultat est constaté avec la souche ECHO type II GREGORY, 6 passages ne révèlent aucune modification importante de l'hémagglutinine.

Les résultats sont donnés dans le tableau I3:

		ECHO type 7	ECHO type II
Passage	I	I28	64
	2	I28	32
	3	256	64
	4	I28	64
	5	I28	32
	6		64

Tableau nº I3

Une autre expérience, effectuée dans un deuxième temps, avec 2 souches d'ECHO type 6 isolées au laboratoire nous montrait des résultats différents.

En effet, après isolement, deux souches (2206 - 22I2) subissaient un premier passage sur culture de reins de babouin. Nous leur trouvions alors un pouvoir agglutinant nous permettant de les identifier, par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, comme étant des ECHO type 6.

Après le premier passage, à partir duquel elles étaient typées, ces souches étaient cultivées 2 fois sur les mêmes cellules, nous constations que le pouvoir hémagglutinant baissait, puis disparaissait (tableau I4).

	0 2206	0 22I2
Passage I	30	30
2	20	I5
3	< I0	< I0

Tableau nº I4

Nous avons pensé au rôle possible joué par un inhibiteur dans le milieu et avons repris nos essais en effectuant les passages à partir de l'extrait de selles ayant servi à l'isolement primitif, le cultivant à la fois sur des cellules de reins de babouin et sur des cellules amniotiques humaines, en présence de 3 milieux :

- Hydrolysat de lactalbumine 0,5 % en solution de Hanks
- Hydrolysat de lactalbumine 0,5 % en solution de Hanks + 30 % de liquide amniotique
- Nº I94 de Parker modifié par P. LEPINE,

ce qui nous amenait à l'étude d'un troisième point :

3 - Influence des méthodes de cultures utilisant soit des cellules soit des milieux différents

La souche 2206, chez laquelle nous avions suivi la perte du pouvoir hémagglutinant, était reprise à partir de l'isolement primitif réalisé sur culture de reins de babouin et en milieu de Parker.

On inoculait avec 0,I ml de chaque tube, I5 tubes de reins de babouin groupés en 3 lots, chaque lot recevant 0,9 ml d'un des 3 milieux cités plus hauts.

Une expérience identique était faite sur cellules amniotiques.

Les résultats montrent :

- qu'il y a nette diminution du taux d'hémagglutination du premier au second passage,
- que les cellules de reins de babouin ont une plus grande sensibilité à l'hémagglutinine que les cellules amniotiques (ceci n'a pas été vérifié pour d'autres souches que la souche 2206 d'ECHO type 6 utilisée dans cet essai),
- que les 3 milieux ne présentent pas de différence.

Ces résultats sont groupés dans le tableau I5 :

	Reins de babouin			Cellules amniotiques		
2206 ECHO t. 6	LACT	LACT + 30% liq. amniotique	PARKER	LACT	LACT + 30 % liq. amniotique	PARKER
1er passage	I28	I28	I28	4	4	4
2ème passage	I6	I6	I6	2	2	2

Tableau nº I5

Nous ajouterons, bien que ceci n'entre pas dans le cadre imparti à nos recherches qu'un comportement similaire a été noté avec une souche d'ECHO type IO (souche I907) dont nous avons vu l'hémagglutinine disparaitre dans les mêmes conditions.

En résumé, le temps de stockage du virus semble, dans certains cas, pouvoir être incriminé dans la disparition du pouvoir hémagglutinant, mais dans d'autres cas nous avons vu l'hémagglutinine diminuer et disparaitre sans qu'il soit possible de trouver une explication valable, la nature du milieu ne semblant pas en cause.

Nous devons attirer l'attention sur le fait que le terme de "disparition" de l'hémagglutinine ne tient compte que de l'aspect pratique et apparent du phénomène et il nous paraitrait plus juste de parler de "masquage" ou d'"inhibition" de l'hémagglutinine.

Dans le même point de vue, l'expérience d'une souche de type 6" (prototype BURGESS) est instructive. Lorsque nous avons reçu cette souche, elle se montra hémagglutinante entre nos mains, on nous affirme ultérieurement qu'elle ne l'était pas dans le laboratoire qui nous l'avait envoyée.

C'est le seul exemple que nous ayons d'une souche ayant perdu puis retrouvé son hémagglutinine.

Ceci, joint aux investigations de LAHELLE (34) qui montre qu'un sérum de lapin préparé contre la souche d'AMORI non hémagglutinante, est capable d'inhiber l'hémagglutination par d'autres types 6, nous incline à penser que,pour des raisons qui nous échappent encore mais qui sont liées plus aux conditions d'entretien des souches qu'à une hétérogénéité antigénique constitutionnelle, l'hémagglutinine est soit cachée par des inhibiteurs, soit inhibée momentanément.

Dans le premier cas, quoique présente dans les liquides, elle ne pourrait être révélée, ce qui expliquerait qu'elle puisse cependant susciter l'apparition d'anticorps inhibants chez le lapin. Dans la seconde hypothèse, la production en serait momentanément interrompue, puis serait susceptible de réapparaitre après modification des conditions de multiplication du virus, comme tend à le faire penser notre expérience sur la souche BURGESS.

Nous pouvons rapprocher de ces faits les expériences de MAISEL, MOSCOVICI et LA PLACA (38) qui, ayant adapté différents types de virus ECHO à des lignées cellulaires continues (HeLa et KB),ont constaté que les hémagglutinines des types 3, II et I9 ont été perdues pendant l'adaptation et qu'elles n'ont pas été récupérées par passages sur cellules de reins de singe.

En résumé, il y a pour les ECHO type 3, 6, I0 (devenu Réovirus), I3, I8, 20, 22, 23, des divergences dans les possibilités d'hémagglutination. Des hypothèses sont émises cherchant à expliquer le phénomène, il reste à faire la démonstration de leur exactitude. Il serait d'un grand intérêt que des travaux ultérieurs y soient consacrés car ceci conditionne la valeur de l'emploi de la réaction d'hémagglutination en pratique courante.

VII - /Essai de détection d'une hémagglutinine à partir des virus ECHO considérés actuellement comme non hémagglutinants/

Le bilan des types ECHO hémagglutinants par rapport au nombre total de types connus est faible puisque, au cours de notre travail, nous trouvions seulement 8 types sur 29 possédant cette propriété. Les applications pratiques en sont, de ce fait, limitées, c'est pourquoi nous avons essayé d'orienter nos recherches vers des techniques qui permettraient de déceler une hémagglutinine, qui n'aurait pu agir, sans traitement préalable des liquides antigéniques.

Nous avons, dans ce but, utilisé trois sortes de techniques :

A/ - Le traitement des liquides par les ultrasons
B/ - Le chauffage des liquides cellulaires
C/ - Le traitement par le kaolin

A) - Traitement des liquides par les ultrasons

Les vibrations ultrasoniques sont capables de modifier les titres hémagglutinants de certains virus.

HERMODSSON (23) décrit la modification du taux hémagglutinant constaté chez des virus para influenzæ lorsqu'ils étaient soumis aux ultrasons. Le virus grippal, d'après les travaux de LIEF et HENLE ne possède pas cette propriété (cité par HERMODSSON).

Nous avons soumis à l'action des ultrasons, deux types de virus ECHO non hémagglutinants : types 5 et 8, deux types de virus hémagglutinants : types II et I9.

Ces quatre souches étaient cultivées sur boite de Roux (reins de babouin), récoltées après dégénérescence complète des cellules, centrifugées 20 minutes à 3500 tours sur centrifugeuse de type Jouan pour éliminer les cellules.

L'expérience a été faite sur le surnageant : 20 ml de chaque liquide viral était soumis à l'action des ultrasons I0 minutes à 20 kc/sec(º).

On réalisait ensuite une recherche ou un titrage de l'hémagglutinine avant et après ultrasonation.

Les résultats s'avéraient négatifs ou ne révélait aucune hémagglutinine chez les virus de type 5 et 8, décrits comme non hémagglutinants, et le taux des virus hémagglutinants ne variait pas.

(º) - Nous remercions Monsieur le Professeur BADINAND qui a bien voulu mettre à notre disposition un appareil à ultrasons.

Le type II avait, avant et après traitement par les ultrasons, un titre de I/40ème, le type I9 titrait I/320ème dans les deux cas.

B) - Chauffage des liquides cellulaires

Le chauffage des liquides cellulaires a été utilisé par différents auteurs pour potentialiser l'action d'une hémagglutinine ou même la révéler.

DEINHARDT, HENLE et MARKS (24) utilisent cette méthode dans l'hémagglutination par le virus du polyome.

Ils pensent que l'irrégularité des réactions obtenues avec ce virus est due à la présence d'inhibiteurs dans les cultures utilisées, inhibiteurs qui sont inactivés par un chauffage à 37º.

GROSS (I9) décrit l'agglutination d'hématies de souris par des filtrats de leucémie de la souris rendus agglutinables par chauffage à 55º, une demie-heure.

Nous avons, pour cette expérience, étudié le comportement après chauffage à 37º et à 56º de la souche d'ECHO type 5 non hémagglutinante et de la souche ECHO type 7 hémagglutinante.

Les liquides cellulaires ont été chauffés ½ heure à 37º et à 56º au bain-marie ; puis engagés dans une réaction d'hémagglutination classique.

Les résultats ont montré que l'ECHO type 5, non chauffé ou chauffé soit à 37º, soit à 56º, h'hémagglutinait pas.

L'ECHO type 7 chauffé à 37º a le même titre qu'avant chauffage et il est totalement inactivé par un chauffage de ½ heure à 56º.

C) - Traitement par le kaolin

Nous verrons, dans un chapitre suivant, qu'après de nombreux essais pour éliminer les inhibiteurs non spécifiques du sérum, nous

nous sommes arrêtés à la technique utilisant une suspension de kaolin décrite par CLARK et CASALS (9).

Cette technique supprime les inhibiteurs de nature lipoprotéique par adsorption sur une suspension de kaolin à 25 %.

Ce procédé nous donnant entière satisfaction dans la délipidation des sérums, nous avons pensé qu'il pouvait être essayé pour éliminer d'éventuels inhibiteurs lipidiques présents dans les virus ECHO non hémagglutinants.

Au cours de nos premiers essais, nous avons réalisé une adsorption classique en utilisant :

1 volume de liquide viral (ECHO type 5)
4 volumes de tampon
5 volumes de suspension de kaolin à 25 %.

Ce mélange est laissé 20 minutes à la température de laboratoire puis centrifugé 30 minutes à 2500 tours/minutes.

Le surnageant est décanté et engagé dans une réaction d'hémagglutination.

Nous eumes la surprise de voir l'ECHO type 5 devenir hémagglutinant. Reprenant nos essais, nous nous sommes aperçus :

- qu'après la centrifugation, lorsque le surnageant n'est pas décanté avec soin, il faut entrainer quelques particules de kaolin capables d'avoir un pouvoir hémagglutinant.

En effet, un témoin réalisé avec :
5 volumes de tampon
5 volumes de suspension de kaolin .

lorsqu'il n'était pas décanté avec grand soin, pouvait aussi avoir un pouvoir hémagglutinant.

- que le virus n'était pas là où nous le cherchions, car il s'adsorbait sur le kaolin et se retrouvait par conséquent après la centrifugation dans le culot.

Ceci fut mis en évidence de deux manières :

a) - Traitement d'un ECHO hémagglutinant : ECHO type 7 par le kaolin.

L'ECHO type 7 est traité par le kaolin dans les mêmes conditions que précédemment.

Le surnageant, décanté avec précaution et engagé dans une réaction d'hémagglutination, a un titre hémagglutinant inférieur à IO alors que le liquide viral avant traitement avait un titre de 256.

L'hémagglutinine n'est donc pas dans le surnageant.

b) - Détermination du titre infectieux du culot et du surnageant après traitement d'un virus ECHO par le kaolin.

Lorsqu'un ECHO type 5 de DICT 50 $IO^{-6,83}$ est adsorbé sur kaolin, le surnageant a une DICT 50 inférieure à IO^{-2} alors que le culot a une DICT 50 supérieure à IO^{7} .

Le virus se retrouve au niveau du culot de kaolin où il se concentre.

C H A P I T R E II

ETUDE DE LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION

Le caractère hémagglutinant spécifique d'un virus n'est prouvé que dans la mesure où l'on peut inhiber la réaction d'hémagglutination par des anticorpsspécifiques apportés par le sérum contre le virus hémagglutinant d'un homme ou d'un animal immunisé. Cette réaction d'inhibition de l'hémagglutination a lieu en deux temps :

- le premier correspond à la mise en contact : sérums d'animaux immunisés, en dilutions croissantes et virus à un taux convenablement choisi, contact qui s'effectue à une température convenable.
- le deuxième consiste en l'addition de la suspension globulaire, sédimentant dans les mêmes délais et à la même température que dans la réaction d'hémagglutination correspondante.

Le titre inhibiteur d'un sérum est exprimé par l'inverse de la plus grande dilution capable d'inhiber complètement l'hémagglutination.

I - Préparation de sérums d'animaux immunisés

LAHELLE (33) immunise de jeunes lapins par injection intrapéritonéale de I5 ml de virus pur, chaque jour, pendant 3 jours.

ZAFFIRO et DARDANONI obtiennent des sérums d'animaux immunisés chez le lapin par inoculation de liquide viral par différentes voies :

- 2 inoculations intradermiques de 0,I ml chacune,
- 2 inoculations intramusculaires de 2 ml de l'émulsion à 7 jours d'intervalle :

virus pur
huile minérale (Bayol)
Arlacel IO %

- Après 7 jours, 3 inoculations intraveineuses de 1 ml chacune, un jour non l'autre.
- 2 cycles de ce type à 7 jours d'intervalle.
- IO jours après la dernière inoculation, saignée à blanc de l'animal.

La technique d'immunisation utilisée au cours de ce travail, dérive de celle de LAHELLE :

De jeunes lapins de moins de 2 kgs reçoivent I5 ml de virus pur par voie intrapéritonéale, chaque jour, pendant 3 jours.

L'inoculat s'obtient par culture sur reins de singe en boites de Roux d'une quantité de virus capable de faire dégénérer les cellules en 48 à 72 heures.

L'inoculat ne comporte que le surnageant de la culture.

Signalons une technique pratique qui consiste à réserver les cellules infectées à la fabrication d'un antigène suivant la méthode détaillée plus loin, tandis que le surnageant sert d'inoculat pour obtenir chez l'animal le sérum immun correspondant.

Les prélèvements s'effectuent par ponction de la veine marginale de l'oreille, 7 jours après la première inoculation, d'un volume d'environ 5 ml de sang.

Le sérum est engagé dans une réaction d'INHA (9). Si le titre du sérum en anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination est satisfaisant, on prélève la plus grande quantité possible de sang du lapin en utilisant cette fois la ponction intracardiaque, à blanc.

---

(9) - Lire désormais pour réaction d'inhibition de l'hémagglutination : réaction d'INHA.

Dans le cas d'un sérum non satisfaisant, l'immunisation se poursuit par injection intramusculaire du mélange :

Virus pur 2,5 ml
Huile minérale 1 ml
Poudre de bacille de Koch tué 5 mmg

à raison d'une injection tous les I5 jours pendant 3 mois.

II - Les inhibiteurs non spécifiques présents dans les sérums

Nos premiers essais d'INHA ont été effectués au moyen de sérums d'animaux immunisés de lapins et de singes vis-à-vis des ECHO type 7 et II. Lors des premières réactions, nous avons constaté que les sérums de lapins prélevés avant immunisation, donc "sérums normaux" étaient capables d'inhiber la réaction d'hémagglutination à des taux aussi élevés que les sérums d'animaux immunisés. Tous les sérums étudiés contenaient par conséquent des inhibiteurs non spécifiques qu'il fallait éliminer; problème que nous avons mis quelque temps à résoudre, d'autant qu'il en était peu question dans la littérature à ce moment là.

GOLDFIELD (I8) signale dans son premier travail sur l'hémagglutination par les virus ECHO la possibilité d'inhibiteurs non spécifiques à la fois dans les sérums humains et animaux, inhibiteurs qu'il ne faut éliminer. L'auteur note que le problème de leur élimination conditionne la valeur de la réaction d'inhibition.

LAHELLE (33) note la possibilité d'une inhibition non spécifique dans les sérums de lapins à des dilutions basses : du I/2 au I/I6.

ZAFFIRO et DARDANONI (I3) utilisent les sérums de singes à la dilution de I/50 et les sérums de lapins à la dilution du I/8 pour éliminer les inhibiteurs non spécifiques présents dans les sérums à des dilutions plus faibles.

Les inhibiteurs que nous avons trouvés dans les sérums de lapin, de cobaye, de singe, humain, existaient à des taux bien supérieurs à ceux décrits par LAHELLE et par ZAFFIRO et DARDANONI.

Les sérums de lapin avaient des inhibiteurs non spécifiques à des titres supérieurs ou égaux à 1000, de même que les sérums humains ou les sérums de singe. Cette constatation, en ce qui concerne les sérums de lapin, ne semble pas avoir été faite par les auteurs qui ont publié les travaux sur ce sujet là. Nous n'avons pas à ce jour expliqué cette divergence.

Les sérums de cobaye avant immunisation, contenaient aussi des inhibiteurs non spécifiques, mais à des taux plus faibles : de 64 à 256.

A) - Traitement par le périodate de potassium

La première technique que nous avons utilisée est celle qui permet d'éliminer les inhibiteurs non spécifiques présents dans les sérums engagés dans la réaction d'INHA du virus grippal selon la méthode de DAVOLI.

On prépare une solution de périodate de potassium à 0,5 %. La solution est agitée 2 heures sur l'agitateur de Kahn, puis laissée une nuit à 4 º.
Le lendemain, elle est à nouveau agitée 1 heure.
Les sérums sont décomplémentés par chauffage d'une demi-heure à 56º.

A 0,25 ml de sérum dilué au ½
on ajoute 0,25 ml de tampon
0,50 ml de solution de IO_4K à 0,5 %. Contact 20 minutes à la température du laboratoire
I ml de glucose à 10 %. Contact 20 minutes à la température du laboratoire.

La dilution du sérum ainsi traitée est du 1/16.

Les sérums de lapins "normaux", traités par le périodate, contenaient encore des inhibiteurs non spécifiques à des taux allant de I28 à 5I2.

Dans les sérums humains et de cobaye, les inhibiteurs étaient aussi diminués, mais demeuraient à des taux non négligeables. Quelques exemples de résultats trouvés, sont notés dans le tableau I.

		Avant traitement par le périodate	Après traitement par la périodate
Lapin	63	2048	I28
	70	4096	256
	59	4096	5I2
Sérums humains	IIOII	> 5I2	256
	I0993	> 5I2	256
	I099I	> 5I2	5I2
Cobaye	lot I	256	64
	lot 2	256	8
	lot 3	64	32

Tableau nº I

B) - Chauffage des sérums

De même que nous avons utilisé le chauffage pour essayer de supprimer des inhibiteurs qui pouvaient être présents dans les liquides viraux, nous avons également essayé de chauffage à 60º pour supprimer des sérums les inhibiteurs non spécifiques.

Pour cette expérience,des sérums de cobayes avant immunisation étaient chauffés une demi-heure à 56º et à 60º, puis engagés dans une réaction d'INHA en présence de 8 unités hémagglutinantes de virus ECHO de type 7.

A titre d'exemple, un sérum de cobaye, qui sans traitement, avait un taux d'inhibiteurs de I28, le conservait après chauffage une demi-heure à 56º et le voyait même augmenter jusqu'à 256 après chauffage à 60º.

La méthode de chauffage était donc sans effet sur les inhibiteurs non spécifiques présents dans les sérums.

C) - Traitement par le receptor destroying enzyme (RDE)

On sait que cet enzyme est une neuraminidase sécrétée par diverses bactéries, notamment le vibrion cholérique : de spécificité très voisine de la neuraminidase présente dans le virus grippal, il est utilisé à la place de cette dernière, à diverses fins et notamment pour réaliser l'élution du virus grippal de l'hématie de poule sur laquelle il se fixe et pour éliminer des sérums les inhibiteurs anti-grippaux.

Plusieurs techniques ont été décrites à partir de la souche de vibrion cholérique 4 Z. C'est cette souche que nous utilisons. Elle est repiquée dans quelques millilitres de bouillon "Brain-Heart" (DIFCO) : ce bouillon incubé 6 heures sert d'inoculum pour de grandes boites de Roux de un litre contenant I50 ml de bouillon "Brain-Heart" (1 ml d'inoculum pour 1 boite).

L'incubation de ces boites ne doit pas dépasser I5 à I6 heures sinon l'enzyme tend à disparaitre des liquides.

Au moment opportun, l'enzyme est stabilisé grâce à une solution de Cl_2Ca à 0,5 %, puis la culture est filtrée afin d'éliminer les corps bactériens et le filtrat est utilisé après titrage de son activité enzymatique par agglutination des hématies de poule. Dans la réaction, les sérums à expertiser et le RDE utilisé à une dilution convenable, sont mis en contact pendant I8 heures à 37º.

Le mélange est chauffé ensuite une demi-heure à 56º pour stopper l'action du RDE.

On effectue alors une réaction d'INHA en présence de 8 unités hémagglutinantes d'ECHO type 7.

Nous avons, de cette manière, soumis à l'action du RDE des sérums humains, de cobayes et de lapins avant immunisation.

Quelques résultats obtenus par le traitement des sérums avec le RDE sont résumés dans le tableau 2.

	Avant traitement	Après traitement par RDE
Lapin 70	4096	5I2
63	2048	5I2
60	I024	I28
Cobaye	I28	256
Sérums humains	5I2	5I2

Tableau nº 2

Le traitement au RDE, s'il réussissait dans quelques cas à diminuer le taux des inhibiteurs non spécifiques : dans les sérums de lapins, le taux d'inhibiteurs était divisé par 4 ou 8, ne pouvait complètement les éliminer, il fallait donc trouver une technique plus efficace.

D) - Extraction par l'éther acétone

Pensant que la nature des inhibiteurs pouvait être lipidique, nous avons repris la technique de délipidation des sérums décrite par W.P. HAVENS et étudiée dans la thèse de DUSONCHET (I5).

Les lipides sont éliminées des sérums par une série d'extraction à l'acétone éther en opérant à 0º.

La technique en est la suivante :

Les sérums sont placés dans un tube à centrifuger maintenu dans un bain de glace.

On extrait par IO ml d'acétone au cours d'un contact de 20 minutes en agitant toutes les 5 minutes : les lipides passent en solution dans l'acétone et il se forme un précipité constitué par les éléments protéiques des sérums.

Le surnageant est éliminé par aspiration par trompe à vide.

On réalise une deuxième extraction par l'acétone en remettant en suspension le culot protéique puis un nouveau contact de 20 minutes en agitant toutes les 5 minutes.

On procède ainsi à une série d'extractions par le mélange acétone éther, puis par l'éther.

Le précipité est desséché puis les sérums reconstitués par une solution tampons phosphate de manière à obtenir une dilution au I/IO.

Résultats

Après traitement à l'éther acétone, 8 sérums humains expertisés avaient des taux d'anticorps inhibiteurs allant de 20 à 80. Ces résultats orientaient vers la présence d'inhibiteurs non spécifiques de nature lipidique dans les sérums, puisque diminués de façon très nette par une extraction éther acétone.

Nous avons pensé que la nature de ces inhibiteurs probablement lipidique ou lipoprotéique, pouvait être comparable à ceux trouvés dans les sérums, pour les hémagglutinines des virus Arbor.

Ces inhibiteurs signalés par SABIN et coll. se retrouvent à des taux importants et peuvent être éliminés par deux techniques décrites par CLARKE et CASALS (8,9).

Ces deux techniques consistent :

- soit en une extraction à l'acétone, technique de référence d'après CLARKE et CASALS,
- soit en un traitement par le kaolin : traitement empirique basé sur l'adsorption sélective des lipoprotéines dans des conditions bien définies.

Technique décrite par les auteurs comme une technique de routine, par sa simplicité.

E) - Extraction par l'acétone

Le principe de la méthode est basé sur la solubilité des inhibiteurs non spécifiques de nature lipidique et l'insolubilité des anticorps protéiques.

La méthode réalise plusieurs extractions successives par l'acétone : les manipulations ont lieu dans un bain de glace, tout le matériel étant maintenu à 4º.

Le sérum est dilué IO fois en eau physiologique (volume de départ : O,I5 ml).

Au sérum est ajouté I2 volumes d'acétone refroidie. On agite vigoureusement et on laisse 5 minutes à 4º : il se forme un précipité abondant.

On centrifuge 5 minutes à 2000 tours dans un plot réfrigéré, on obtient un culot abondant formant un dépôt adhérent.

On décante, le culot est repris dans I2 volumes d'acétone refroidi, on agite avec vigueur, le précipité abondant qui se forme à 4º est centrifugé, puis desséché sous vide, dans un vase à dessication.

Il est repris dans la quantité nécessaire de tampons pour avoir une dilution au I/IO. La dissolution s'effectue en laissant la préparation une nuit à 4º.

Sur des sérums ainsi traités, les résultats étaient excellents les sérums de cobayes ne contenaient plus d'inhibiteurs non spécifiques, les sérums humains n'en avaient plus qu'à la dilution au I/IO.

F) - Méthode au kaolin

L'extraction par l'acétone étant longue et pouvant difficilement être mise en oeuvre en pratique courante, nous avons essayé le traitement des sérums par une suspension de kaolin, méthode préconisée par CLARKE et CASALS (8,9).

La technique originelle de ces auteurs utilise du kaolin lavé acide (firme Amend and Co. - New-York).

Une communication du Professeur CASALS nous ayant indiqué qu'il utilisait, après un certain nombre d'essais, un kaolin d'une autre firme, nous avons essayé deux sortes de suspensions de kaolin :

- "kaolin Acide Washed" du Fisher Laboratory Chemical
- kaolin lavé acide des Ets Merck. (º)

La technique d'adsorption est la suivante :

On prépare une suspension de kaolin à 25 % en tampons phosphate à pH 7,3 - 7,4. Cette suspension est stable et peut se conserver à 4º.

Au moment de l'adsorption des sérums, on met en contact :

- 1 volume de sérum pur
- 4 volumes de solution tampons phosphate
- 5 volumes de suspension de kaolin

Le contact a lieu pendant 20 minutes à la température du laboratoire en agitant de temps en temps.

(º) - Nous remercions le Professeur CASALS de nous avoir procuré un échantillon de kaolin acide washed du Fisher Laboratory Chemical.

On centrifuge à 2500 tours pendant 30 minutes à la température du laboratoire. Le surnageant est recueilli, il représente une dilution du sérum au I/IOème. Il peut être congelé à - 20º et stocké jusqu'à la mise en oeuvre de la réaction d'INHA.

Les deux suspensions de kaolin essayées, nous ont donné des résultats équivalents : les sérums humains, de cobayes et de lapins n'ont plus d'inhibiteurs non spécifiques à la dilution au I/IOème.

C'est la technique que nous avons adoptée.

Elle est d'une réalisation simple, permet le traitement des sérums dans un premier temps, la réaction d'INHA pouvant être effectuée dans un deuxième temps.

La solubilité des inhibiteurs non spécifiques dans l'acétone et l'adsorption sur une suspension de kaolin confirment la similitude de ces substances avec celles présentes dans le sérum lors de l'inhibition de l'hémagglutination des virus Arbor.

Il s'agit bien de lipides ou de lipoprotéines.

Pour préciser davantage la nature de ces inhibiteurs, nous avons essayé de les précipiter par une solution d'héparine selon la technique préconisée par BURSTEIN et SAMAILLE (5).

En effet, en présence de chlorure de calcium et en abaissant la force ionique du sérum par adjonction d'eau distillée, l'héparine est capable de précipiter sélectivement sans les dénaturer les lipoprotéines.

Nous avons précipité les β lipoprotéines des sérums de lapin avant et après immunisation, puis engagé dans une réaction d'INHA :

- le surnageant, débarrassé des inhibiteurs, si ceux-ci sont des lipoprotéines,
- le culot contenant éventuellement ces inhibiteurs.

Nous avons ainsi procédé :

à 0,2 ml de sérum à étudier, nous avons ajouté

2 ml de solution 0,025 M de Cl_2Ca dans de l'eau distillée

0,4 ml de solution d'héparine à 1 ‰ (Liquemine Roche).

Il se forme rapidement un trouble.

Le précipité est séparé par centrifugation 15 minutes à 5000 tours, puis décanté.

On engage simultanément dans une réaction d'INHA :

- le surnageant : théoriquement débarrassé des inhibiteurs, si notre hypothèse se confirme,
- le culot repris dans 0,4 ml de tampons phosphate.

Les résultats, donnés dans le tableau 3, montrent que 2 sérums qui, non traités, ont un taux d'inhibiteurs non spécifiques de 512, ont après traitement par le kaolin et après précipitation par l'héparine, dans le surnageant un taux d'inhibiteurs nul.

Il semble donc que ces inhibiteurs non spécifiques soient de nature ? lipoprotéique.

Nous n'avons pas multiplié les expériences sur ce point, des études ultérieures pourraient le confirmer.

	Sérum non traité	Sérum traité par le kaolin	Surnageant après traitement par héparine	Culot après traitement par héparine
Lapin 59 ECHO type 7	512	0	0	100
Lapin 58 ECHO type II	512	0	0	100

Tableau nº 3

DARDANONI et ZAFFIRO signalent dans les réactions d'INHA l'aspect modifié du culot globulaire en présence de sérums de lapins non immuns ou immuns, rendant la lecture des réactions difficile.

Nous avons également vérifié les modifications du sédiment lorsque la réaction s'effectuait en présence de sérums non traités. L'adsorption des sérums sur kaolin lève totalement cette difficulté et la lecture des réactions d'INHA devient superposable à celle des réactions d'hémagglutination.

BUSSELL, KARZON et HALL (6) notent dans un article publié en Janvier 1962, la présence d'inhibiteurs non spécifiques dans les sérums engagés dans une réaction d'INHA par les virus ECHO, inhibiteurs qu'ils éliminent par deux sortes de techniques :

- traitement par la trypsine,

- traitement par une suspension de bentonite.

Le traitement à la trypsine est réalisé en ajoutant ½ volume de trypsine DIFCO I/250 à 8 mg/ml à 1 volume de sérum et en chauffant le mélange à 56º pendant 30 minutes.

La suspension de bentonite est préparée en tampons phosphate, on mélange un égal volume de suspension de bentonite et de sérum dilué au I/4. Le mélange est placé à la température du laboiratoire, puis centrifugé 30 minutes à 2500 tours pour éliminer la bentonite. Le sérum est décanté puis chauffé à 56º C. pendant 30 minutes.

BUSSELL, KARZON et HALL essaient le périodate, le RDE, l'adsorption sur hématies sans résultats.

Le traitement à la trypsine et l'adsorption sur bentonite donnent de bons résultats, mais le traitement des sérums avec une suspension de bentonite à I % risque d'enlever aussi les anticorps inhibiteurs spécifiques.

Les auteurs préconisent l'emploi d'une suspension de bentonite à 0,I% qui supprime les inhibiteurs non spécifiques sans enlever les inhibiteurs spécifiques.

Ils ont également essayé une suspension de kaolin à 25 %.

Le traitement des sérums par la trypsine donne des résultats inférieurs à ceux obtenus avec la bentonite ou le kaolin.

Ces résultats que nous n'avons pu consulté qu'après nos travaux sur les inhibiteurs non spécifiques nous confirment la nature lipoprotéique des inhibiteurs puisque leur disparition est favorisée par des substances connues pour leurs propriétés adsorbantes vis-à-vis des lipoprotéines comme le kaolin ou la bentonite.

III - Présence d'agglutinines dans les premières dilutions de sérum

Tous les auteurs ont signalé la présence d'agglutinines antihématies humaines, dans les sérums, à des titres variables.

DARDANONI et ZAFFIRO (I3) signalent la présence d'agglutinines dans les sérums de lapins à des titres allent de 8 à I00.

LAHELLE (34) note des agglutinines dans les sérums de lapins à des titres de 4 à 5I2, avec une moyenne de 64.

Ces agglutinines ont été trouvées dans les sérums de singes et de lapins que nous avons utilisés.
Elle sont éliminées par adsorption sur culot d'hématies humaines O.

La technique en est simple :

On met en contact 3 heures à 4º :

1 volume de sérum
1 volume de tampons
1 volume de culot globulaire (après 3 lavages en tampons phosphate).

Après le contact, le sérum est décanté.

S'il est nécessaire, l'opération est recommencée.

Lorsque les sérums sont adsorbés sur kaolin, il y a persistance des agglutinines, mais le taux est abaissé par rapport à celui des sérums non traités par le kaolin.

En effet, le titre maximum d'agglutinines que nous ayons rencontré pour les sérums traités, est de 40 ; le titre le plus fréquent étant de 20.

Lorsque nous faisions une identification de souches au moyen de sérums dont nous connaissions le taux d'agglutinines, nous n'avons pas procédé à une adsorption sur hématies.

Il est évident qu'il n'en est pas de même lorsqu'on recherche une montée d'anticorps dans une paire de sérums humains et qu'il est nécessaire alors de procéder à une adsorption.

IV - Technique de la réaction d'INHA

A) - Les souches

Nous avons utilisé au cours des réactions d'INHA tous les types de virus ECHO hémagglutinants dont nous possédions les anti-sérums correspondants, les ECHO type 3, 6", 7, II, I2 et I9.

Toutes ces souches étaient préalablement titrées dans une réaction d'hémagglutination et utilisées dans la réaction d'INHA à la dose de 4 à 8 unités hémagglutinantes.

B) - Les sérums

Ils provenaient :

- soit de singes (sérums de référence de la National Foundation for Infantile Paralysis)

- soit de lapins, nous avons donné précédemment la technique d'immunisation.

Tous les sérums étaient traités par la suspension de kaolin à 25 % puis conservés au congélateur à - 20º.

C) - Le diluant

On réalisait les réactions d'INHA dans les mêmes conditions que celles d'HA, en employant pour les réactions de routine un tampon phosphate à pH 7,3 - 7,4.

D) - Les hématies

On utilise la suspension à 0,5 % préparée dans les mêmes conditions que pour la réaction d'HA.

E) - Technique

La réaction s'effectue en tubes de 65 x I3 mm de diamètre, dits "tubes à hémolyse".

On réalise des dilutions de sérums sous volume de 0,25 ml.

Chaque tube reçoit 0,25 ml d'une dilution de virus contenant 4 à 8 unités hémagglutinantes.

Le contact sérum - virus s'effectue pendant une demi-heure à 4º.

La suspension d'hématies à 0,5 % estaajoutée dans chaque tube sous volume de 0,5 ml.

La réaction est laissée 3 heures à 4º puis lue.

On définit le titre d'un sérum comme l'inverse de la plus haute dilution capable d'inhiber complètement l'hémagglutination.

V - Valeur des sérums de lapins immunisés

a) - Anticorps inhibiteurs homologues

L'étude du taux des anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination au cours des immunisations montre que le titre maximum des sérums est obtenu au cours de l'immunisation dite "rapide" correspondant à l'injection intrapéritonéale de I5 ml de virus pur. Lorsque l'immunisation se poursuit par injection sous-cutanée tous les I5 jours pendant 3 mois, les taux d'anticorps diminuent.
Les titres des sérums d'animaux immunisés varient de I80 à I280.
Dans deux cas il n'y a eu aucune réponse en anticorps inhibiteurs.
Le tableau 4 groupe les résultats obtenus.

	Taux d'anticorps avant immunisation	Taux d'anticorps après immunisation "rapide"	Immunisation lente			
			Ière inj.	2eme inj.	3ème inj.	4ème inj.
ECHO type 3 (MORRISEY) Lapin 3I	<I0	I280				
ECHO type 6" (BURGESS) Lapin 24	<I0	320				
ECHO type 7 (WALLACE)						
Lapin 59	<I0	I280				
63	<I0	320	320			
70	<I0	640	I60	I60	640	
ECHO type II (GREGORY)						
Lapin 58	<I0	5I20	I280	2560	2560	2560
65	<I0	2560	640	640	320	I60
8I	<I0	I280	NF	320	80	40
ECHO type II (souche isolée I6I6)						
Lapin 85	<I0	640				
86	<I0	<I0				
87	<I0	<I0				
ECHO type I2 (TRAVIS) Lapin 26	<I0	320				
ECHO type I9 (BURKE) Lapin 23	<I0	320				

Tableau nº 4

b) - Anticorps inhibiteurs hétérologues

- Faits publiés

GOLDFIELD (I6) pratiquant des réactions d'INHA avec des sérums de lapins et de singes, hyperimmunisés, ne trouve pas d'anticorps hétérologues à un taux significatif.

LAHELLE (34) signale la possibilité de réactions croisées entre divers types de virus ECHO.

ZAFFIRO (I3) étudiant l'INHA des types 3, 7, I0, II, I2 et I9, par les antisérums de singes et de lapins, montre la spécificité des réactions. Les titres des sérums en anticorps inhibiteurs obtenus par l'auteur sont inférieurs à ceux des anticorps neutralisants et sont abaissés par adsorption sur hématies humaines.

ZAFFIRO ne trouve pas d'anticorps hétérologues à des taux supérieurs à ceux trouvés dans les sérums normaux.

BUSSELL, KARZON et HALL (6), dans une étude des facteurs influençant l'INHA, ne trouvent pas de réactions croisées. Leurs tests sont effectués au moyen de sérums de lapins hyperimmunisés en utilisant 4 unités hémagglutinantes de virus.

Les titres des sérums homologues vont de 80 à I200. Quelques très faibles réactions croisées sont observées à des taux de I/I0 au I/20 pour l'ECHO type I2 vis-à-vis des sérums de type 3 et 6.

- Résultats

Tous les sérums engagés dans les réactions d'inhibition de l'hémagglutination ont été traités au kaolin, selon la technique décrite ci-dessus.

La dose de virus employée dans la réaction est de 8 unités hémagglutinantes.

Le contact sérum - virus a lieu pendant une demi-heure à 4º, la réaction est lue après 3 heures.

Les titres des sérums de lapins en anticorps homologues vont de I60 à I280.

Nous n'avons pas observé de réactions croisées à partir de la dilution au I/IOème, cette dilution étant celle obtenue lors du traitement des sérums par le kaolin.

Nous résumons dans le tableau 5 nos résultats :

	3	6	7	II	I2	I9
ECHO 3 Prototype	I280	<IO	<IO	<IO	<IO	<IO
ECHO 6" Burgess	<IO	320	<IO	<IO	<IO	<IO
ECHO 7 Prototype	<IO	<IO	640	<IO	<IO	<IO
ECHO II Prototype	<IO	<IO	<IO	640	<IO	<IO
ECHO I2 Prototype	<IO	<IO	<IO	<IO	320	<IO
ECHO I9 Prototype	<IO	<IO	<IO	<IO	<IO	I60

Tableau nº 5

c) - Valeur comparée des sérums d'animaux immunisés en anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination et en anticorps neutralisants

La valeur des sérums en anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination a été déterminée selon la technique décrite ci-dessus.

La détermination du taux d'anticorps neutralisants a été faite par une épreuve de neutralisation sur cellules de reins de singe selon la technique suivante :

- 0,25 ml de la dilution de sérum à tester est mélangé avec
- 0,25 ml d'une dilution de virus contenant IOO DICT 50 dans 0,I ml.

Le contact a lieu pendant 1 heure à la température du laboratoire, en agitant 3 fois : au début, au milieu et à la fin de l'heure.

Le mélange sérum - virus est réparti sous volume de 0,2 ml dans 2 tubes de culture ayant reçu au préalable 0,8 ml de milieu de survie.

La lecture s'effectue au 1er jour : on s'assure ainsi qu'il n'y a pas eu d'effet cytotoxique, puis au 4ème jour et au 7ème jour : on suit l'évolution de la dégénérescence cellulaire qui est notée définitivement le 7ème jour.

L'effet cytopathogène est évalué en croix, on retient comme positifs, les tubes dont l'effet est noté au moins ++.

Sur des sérums de lapins préparés à partir d'injections de virus ECHO de type 7 et II, l'évolution des anticorps neutralisants et inhibiteurs est relativement parallèle. L'immunisation dite "rapide" donne un taux d'anticorps inhibiteurs et d'anticorps neutralisants élevé qui tend à diminuer lorsque l'immunisation est poursuivie. Dans quelques cas exceptionnels, l'immunisation dite "lente" a permis une augmentation des anticorps inhibiteurs et neutralisants à des taux supérieurs à ceux de l'immunisation "rapide".

C H A P I T R E III

APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC

I - Identification des souches

Dès la découverte des propriétés hémagglutinantes des virus ECHO, les auteurs ont pensé obtenir avec la méthode d'inhibition de l'hémagglutination, si sa spécificité était démontrée, une méthode d'identification commode.

En effet, l'identification des souches de virus ECHO par la méthode de neutralisation représente un travail considérable, puisque du fait de l'existence de 29 sérotypes, chaque souche doit être confrontée avec 29 sérums.

Il est possible d'utiliser des mélanges de sérums en les combinant de manière à ce que deux mélanges n'aient qu'un sérum commun (méthode de LIM et BENYESH-MELNICK). On a alors un typage plus rapide, mais dont la réalisation demande un délai minimum de 7 jours, dans les mailleures conditions.

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination a, sur la réaction de neutralisation, l'avantage de la rapidité et si l'accord se fait sur sa spécificité, il sera d'un grand intérêt de l'utiliser pour les typages de souches ECHO hémagglutinantes.

Les souches que nous avons isolées et typées l'ont été dans les conditions suivantes :

L'isolement a lieu à partir des selles, qui après traitement, sont inoculées à des tubes de reins de singe (Papio papio).

L'extrait de selles est inoculé à 2 tubes, le premier recevant 4 gouttes, le deuxième 8 gouttes.

Ces tubes sont placés à l'étuve à 35º pendant 3 heures, puis le liquide est rejeté et remplacé par le milieu de survie (hydrolysat de lactalbumine à 0,5 %, liquide amniotique 30 %, antibiotiques).

L'examen des tubes a lieu le premier, le quatrième, le septième, le dixième et le quatorzième jours.

S'il y a dégénérescence des cellules, le liquide est à nouveau ensemencé sur les mêmes cellules de façon à avoir un deuxième passage.

L'identification des virus ECHO est faite en deux temps.

Iº/- Une orientation est donnée :

- si l'on constate que le virus n'est pas neutralisé par les sérums antipoliomyélitiques de types 1, 2 et 3 ;
- si les caractères de la dégénérescence cellulaire ne sont pas du type de celle provoquée par les adénovirus ;
- s'il n'y a pas de pathogénicité pour le souriceau nouveau-né (Coxsackie).

On recherche la présence d'un des 29 types de virus ECHO.

2º/- Une identification précise est effectuée par une méthode immunologique.

Trois sortes de procédés ont été utilisés pour cette identification :

1 - Identification par neutralisation de mélanges de sérums ECHO

Chaque mélange est constitué de 4 sérums contenant 20 unités neutralisantes.

Le virus à identifier est engagé dans la réaction à 100 doses infectieuses.

La réaction de neutralisation s'effectue comme il a été décrit précédemment.

Les souches isolées ont été identifiées simultanément par la méthode de neutralisation et par la méthode d'INHA.

Nous donnons dans le tableau I la constitution des mélanges de sérums tels que nous les avons utilisés pour les identifications de souches.

A titre d'exemple, la neutralisation d'un virus à la fois par le mélange A et C permet de conclure qu'il s'agit d'un ECHO type 6.

SERUMS TYPES	TAUX	20 Unités neutralisantes	A	B	C	D	E	F	G
1 lapin	I024	50		+	+				
2 singe	4000	200	+					+	
3 singe	I0000	500						+	+
5 lapin	I024	50	+						+
6 singe	20000	I000	+		+				
7 lapin	I024	50		+		+			
8 lapin	2048	I00			+		+		
9 lapin	I024	50				+		+	
I0 singe	I6000	800					+		+
II lapin	I024	50			+	+			
I2 singe	5000	250	+					+	
I3 singe	4000	200		+					+
I4 singe	2000	I00				+	+		
I6 lapin	256	I2		+			+		

Tableau nº I

2 - Typage par INHA

Huit unités hémagglutinantes de virus à typer sont engagées en présence de dilutions d'antisérumsde singes ou de lapins de types 3, 6, 7, II, I2, I9.

La réaction s'effectue à pH 7,2 et à 4º.

23 souches isolées ont été trouvées hémagglutinantes.

Leur identification a montré qu'il s'agissait de :

1 ECHO type 4
8 ECHO type 6
1 ECHO type 7
1 ECHO type IO
1 ECHO type II
6 ECHO type I9
1 Coxsackie B_3

Quatre souches n'ont pas pu être identifiées par INHA, ayant perdu, en cours de passages, leur hémagglutinine.

Dans le tableau 2, il est montré un type de réaction obtenue lors d'une réaction d'inhibition de l'hémagglutination, permettant de constater que dans le cas précis : la souche typée est un ECHO type 6.

Dilution du serum	I/20	I/40	I/80	I/I60	I/320	I/640	I/I280	I/2560	I/5I20
Souche 2082 +antisérum singe ECHO 3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
+ antisérum ECHO 7	0	0	0	0	0	0	0	2	2+
+ antisérum ECHO 7	3	3	3	3	3	3	3	3	3
+ antisérum ECHO IO	3	3	3	3	3	3	3	3	3
+ antisérum ECHO I2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
+ antisérum ECHO I9	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Témoins G.R.	0								
Témoins antigènes	3								

Tableau nº 2

3 - Méthode proposée pour un typage rapide des souches utilisant la quantité minimum de sérum

Nous avons essayé de mettre au point une technique, basée sur les différentes propriétés des hémagglutinines permettant d'avoir une orientation sur le type de virus ECHO que l'on cherche à déterminer.

Cette méthode limite le nombre de sérums à utiliser, la preuve du type étant toujours faite finalement par la réaction d'INHA.

Les caractères des hémagglutinines servant à cette différenciation sont les suivants :

- capacité d'hémagglutininer soit :
  - . les hématies humaines non traitées
  - . les hématies humaines trypsinées
  - . les hématies de singe Vervet
  - . les hématies de singe Patas
- possibilité d'élution à différentes températures
  - 20º
  - 37º

L'identification est conduite de la manière suivante : la souche dont on veut connaitre le type est engagée dans une réaction d'hémagglutination avec des hématies O

- Si la réaction est positive, ce peut être un type 3, 6, 7, II, I2, I9, 29.

On utilise 2 dilutions du liquide viral, I/2 et I/4, ces 2 dilutions sont faites en double et portées 3 heures à 4º.

Ensuite une série de dilutions est portée à 20º, l'autre série est placée à 37º.

. s'il y a élution à 20º : on s'oriente vers un ECHO de type II

. s'il y a élution à 37º : on s'oriente vers un ECHO de type 3 ou I9.

. s'il n'y a élution ni à 20º ni à 37º, ce peut être
ECHO 6
29
7
I2

Les ECHO type 7 et I2 sont capables d'agglutiner les hématies de Patas à la différence des ECHO 6 et 29.

On peut différencier les ECHO 7 et I2 par l'agglutination des hématies de Vervet :

l'ECHO 7 à 37º ne les agglutine pas
l'ECHO I2 à 37º les agglutine.

- Si la réaction d'hémagglutination des hématies O est négative :

. on essaye l'hémagglutination des hématies de Vervet : qui oriente vers un ECHO type 4 ;

. on essaye l'hémagglutination des hématies O trypsinées capables d'être provoquée par les ECHO type I ou 20;

On arrive par cette méthode à individualiser 6 groupes de virus ECHO:

ECHO II
ECHO 3 - I9
ECHO 6 - 29
ECHO 7 - I2
ECHO 4
ECHO I - 20

A ce stade on réalise une réaction d'INHA avec les antisérums correspondants, ce qui limite à 2 ou I le nombre de sérums à utiliser.

Nous avons vérifié cette méthode sur 30 souches seulement :

7 souches prototypes

23 souches isolées et partiellement typées selon cette méthode.

Cette technique permet de s'orienter rapidement vers un groupe de virus ECHO, les réactions d'hémagglutination utilisées sont de réalisation simple et rapide. Elle n'a été éprouvée que pour un nombre limité de souches, des recherches ultérieures devront confirmer sa valeur.

II - Recherche d'anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination dans les sérums humains

LAHELLE (34) détermine la montée du taux d'anticorps inhibiteurs chez des malades atteints d'une affection à ECHO 6.

Dans 7 cas il trouve une montée significative du taux des anticorps, le taux du sérum tardif étant au moins 4 fois plus élevé que celui du sérum précoce.

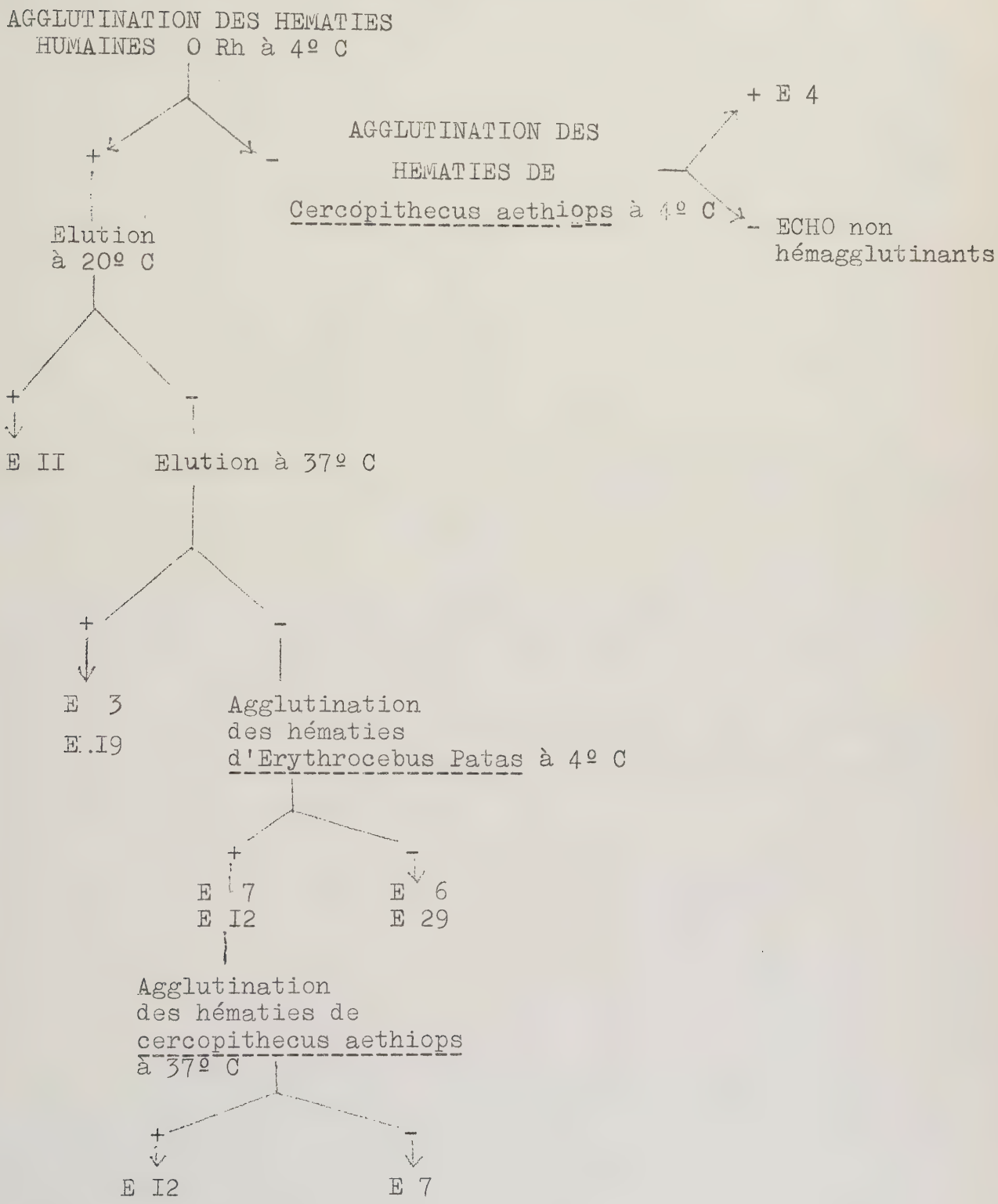
Dans 6 cas il n'observe pas d'élévation mais note que le prélèvement du sérum précoce n'a été obtenu que le 5ème jour de la maladie.

Il signale 1 cas de discordance entre la réaction de neutralisation qui montre une augmentation du taux des anticorps et la réaction d'inhibition qui n'en décèle pas.

LIPPI, BALDUCCI et BENEDETTO (36) réalisent une enquête épidémiologique sur un échantillon de population saine de Ligurie.

Ils recherchent les anticorps fixant le complément et inhibiteurs de l'hémagglutination de l'ECHO type II, sur 76 sérums.

SCHEMA PROPOSE POUR L'IDENTIFICATION DES VIRUS ECHO HEMAGGLUTINANTS



La réaction de fixation du complément d'inhibition a été constamment négative alors que la réaction d'inhibition révélait 4 sérums possédant un taux d'anticorps à un titre significatif.

BUSSELL, KARZON, BARRON et HALL (6) ont étudié l'évolution des anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination, fixateurs de complément et neutralisants au cours d'une épidémie à virus ECHO de type 6. L'étude porte sur 24 sérums prélevés sur des malades atteints de méningite aseptique dont on avait isolé une souche d'ECHO type 6.

Pour chaque malade l'étude a porté sur 3 sérums :

- 1 prélevé au début de la maladie
- 1 prélevé à la convalescence
- 1 prélevé 3 ans après la maladie

Chez 96 % des malades il y a une montée d'anticorps neutralisants, alors qu'il n'y a que 67 % qui ont une augmentation des anticorps inhibiteurs et fixant le complément.

Le taux maximum est atteint au cours de la 2ème semaine de la maladie, les anticorps neutralisants persistent longtemps puisque, trois ans après, leur taux n'a pas varié.

Les anticorps inhibiteurs diminuent rapidement, puis persistent à un taux faible, les anticorps fixateurs du complément sont indécelables ou très faibles après trois ans.

Nous n'avons pas actuellement suffisamment de résultats pour émettre une opinion sur la valeur pratique de cette réaction.

C H A P I T R E IV

D I S C U S S I O N

A la lumière de quelques travaux publiés sur le problème de l'hémagglutination par les virus ECHO, nous avons entrepris une étude de ce phénomène dans un double but :

- d'une part, préciser les caractères des hémagglutinines de chacun des virus ECHO étudiés (3, 4, 6, 7, II, I2, I9 et 29) connus jusqu'ici comme étant hémagglutinants et tenter de déceler celles éventuellement produites par d'autres types ;
- d'autre part, tenter de mettre au point des techniques utilisant l'hémagglutination ou son inhibition à des fins diagnostiques.

Après un bref rappel historique, nous avons procédé à l'étude de la réaction d'hémagglutination proprement dite, de ses modalités, de sa mise en oeuvre et des facteurs divers susceptibles d'influencer le phénomène.

De l'étude critique des méthodes actuellement publiées et de nos investigations personnelles, il ressort essentiellement :

- certains types de virus ECHO sont capables d'agglutiner les hématies humaines de groupe O (types 3, 6, 7, II, I2, I9 et 29) mais certains le sont aussi vis-à-vis des hématies de singe : hématies d'Erythrocebus patas pour les types 7 et I2, hématies de Cercopithecus aethiops pour les types 4, 7 et I2.
- les récepteurs de l'hématie sur lesquels se fixent les virus ECHO apparaissent bien différents de ceux sur lesquels se fixent les myxovirus.

Ces récepteurs ne semblent pas détruits lors de la fixation d'un virus ECHO (type 7) puisque les hématies apparaissent capables ultérieurement de fixer soit un virus de même type, soit un virus ECHO d'un autre type.

La trypsine semble inefficace à modifier le récepteur globulaire pour les types normalement hémagglutinants avec les hématies non traitées, mais semble pouvoir démasquer des récepteurs pour des types réputés non hémagglutinants ou pour lesquels l'hémagglutination est contestée par certains (types I et 20).

Par contre la chymotrypsine (PHILIPSON) semble pouvoir altérer le récepteur de façon telle que des hématies traitées par cet enzyme, deviennent inaptes à fixer un virus hémagglutinant. Ce fait est en faveur d'une structure protéique entrant dans la liaison avec l'hémagglutinine sur le globule rouge, puisqu'elle est détruite par un enzyme protéolytique.

- Si tous les virus ECHO semblent pouvoir agglutiner de façon satisfaisante in vitro les hématies humaines à pH 7,3 - 7,4 et à la température de 4º C, ces conditions ne représentent pas un optimum pour tous les types.

La température de 4º apparait la plus favorable dans la gamme de pH que nous avons étudiée (pH 5,8 à 8,8).

Par contre, des pH alcalins semblent favoriser l'agglutination par le type 3 alors que les pH les plus acides augmentent les capacités hémagglutinantes des types I9 et 29.

Les types 6, 7, II et I2 apparaissent peu sensibles aux variations de pH.

- L'influence de la composition du milieu de culture utilisé pour la production de l'hémagglutinine semble peu nette, cependant le type 7 semble offrir une production d'hémagglutinine plus importante si le milieu est ajusté à pH voisin de 7,6 plutôt qu'à un pH acide.

- La courbe de production d'hémagglutinine dans le temps sur culture de reins de singe ne coïncide pas avec la courbe du titre infectieux, le maximum d'hémagglutinine apparaissant dans la culture plus tardivement que le maximum de doses infectieuses, qui après un clocher assez précoce tend à retomber alors que s'élève le taux d'hémagglutinine.

Le moment de la récolte des liquides infectés pour l'obtention d'antigènes n'est donc pas sans importance.

- Pour assurer une production maximum d'hémagglutinine sur cellules de reins de singe, il semble opportun d'inoculer les cultures avec une dose infectieuse minimum capable de faire apparaitre un effet cytopathogène.

On peut penser que ceci est dû au fait que si l'on inocule une dose trop importante de virus, l'effet cytotoxique inhibe en partie la production d'hémagglutinine.

Il ressort de toutes ces observations que la préparation d'un antigène hémagglutinant nécessite certaines précautions découlant des remarques ci-dessus, que par ailleurs cette hémagglutinine peut être facilement concentrée à partir des cellules elles-mêmes et non du liquide de survie. Si on laisse la purée cellulaire séjourner à 4º pendant une semaine avant utilisation de l'antigène, on peut obtenir des titres hémagglutinants environ IO fois supérieurs à ceux constatés avec le liquide cellulaire des cellules correspondantes.

- Les passages répétés de virus sur cultures de tissu pour certains types ne paraissent pas modifier leurs propriétés hémagglutinantes (types 7 et II en particulier).

Par contre, les hémagglutinines des virus ECHO de type 6 apparaissent particulièrement labiles et susceptibles de disparaitre après un nombre de repiquage assez faible.

C'est ce qu'il ressort de l'étude de souches de ce type, isolées par nos soins, qui ont perdu totalement leur pouvoir hémagglutinant au bout d'un petit nombre de passages, tout en ayant conservé un titre infectieux normal.

- Dans le but de faire apparaitre une hémagglutinine éventuelle chez les virus ECHO connus comme non hémagglutinants, nous avons fait subir aux antigènes divers traitements : chauffage des liquides antigéniques, essai de dissociation moléculaire par les ultrasons, adsorption sur kaolin. Toutes ces tentatives se sont révélées infructueuses.

Le kaolin, s'il est incapable d'éliminer d'éventuels inhibiteurs de l'hémagglutination, fixe le virus et provoque une augmentation du titre infectieux de celui-ci.

Le complément indispensable de la réaction d'hémagglutination est celui de l'inhibition de l'hémagglutination prouvant la spécificité du phénomène.

Après avoir préparé chez le lapin tous les sérums inhibants correspondants au type étudié - préparation dont nous donnons des détails techniques - nous nous sommes heurtés à la présence dans les sérums d'inhibiteurs non spécifiques à des taux élevés (I/IOOOème). Les mêmes inhibiteurs furent retrouvés dans les sérums humains, de singes, de cobayes.

Ces inhibiteurs subsistaient dans les sérums après les traitements classiquement utilisés pour les faire disparaitre, lors des inhibitions par les myxovirus : à savoir le périodate de potassium et la neuraminidase du vibrion cholérique.

Le chauffage des sérums s'avérait également sans action.

Après de multiples essais, nous nous sommes arrêtés à deux techniques : d'une part la délipidation des sérums par l'éther et l'acétone, d'autre part l'adsorption des sérums sur kaolin ; ces méthodes étant décrites par CLARKE et CASALS, pour éliminer les inhibiteurs de nature lipoprotéique présents dans les sérums engagés dans l'INHA des virus Arbor.

Les inhibiteurs non spécifiques présents dans les sérums utilisés dans les réactions d'inhibition de l'hémagglutination, sont capables en effet d'être éliminés soit par extraction par l'éther - acétone, soit par adsorption sur kaolin. On peut penser qu'il s'agit de lipoprotéines, d'autant que ces inhibiteurs sont capables d'être précipités par l'héparine dans un milieu de basse force ionique : propriété spécifique des lipoprotéines.

La technique au kaolin est celle que nous avons adoptée comme technique de routine, à cause de sa simplicité d'exécution.

Il est à noter cependant qu'elle ne fait pas disparaitre les agglutinines antihématies humaines présentes à titre faible dans certains sérums et qu'elle semble pouvoir présenter un inconvénient en cas de manipulation défectueuse, la suspension de kaolin très diluée s'étant, en effet, montrée entre nos mains, capable d'agglutiner à elle seule, une suspension d'hématies.

Après avoir déterminé la méthode à utiliser pour éliminer les inhibiteurs non spécifiques, nous avons pu juger de la valeur des antisérums de lapins préparés.

Ceux-ci ont un titre d'anticorps homologues allant de 80 à 5I60, la méthode d'immunisation dite "rapide" se révélant la plus favorable pour l'obtention de titres élevés.

Tous les sérums préparés n'ont pas montré de taux d'anticorps inhibiteurs hétérologues supérieurs ou égaux au I/IO.

Ayant procédé à une étude des hémagglutinines des virus ECHO, nous avons cherché dans quelle mesure la détection des hémagglutinines pouvait intervenir pour le diagnostic des infections dues à ces virus et pour l'identification des souches isolées.

Nous avons, à partir de l'étude des caractéristiques des hémagglutinines, proposé un schéma d'identification basé sur des critères simples de différenciation des hémagglutinines.

Notre expérience est limitée à 30 souches et devra être confirmée par des recherches ultérieures.

Mais nous avons utilisé également la réaction d'inhibition de l'hémagglutination effectuée sur des sérums de référence pour l'identification des types antigéniques.

C O N C L U S I O N S

L'hémagglutination produite par certains virus ECHO ayant été mise en évidence récemment et un certain nombre de problèmes la concernant n'ayant pas encore été résolus, nous nous sommes proposé de vérifier les faits publiés et de compléter les données acquises à ce jour dans un but non seulement théorique mais pratique.

Notre étude a porté sur les types 3, 4, 6, 7, II, I2, I9 et 29.

Des contrôles et études auxquels nous avons procédé, il ressort essentiellement que :

- Parmi les virus ECHO hémagglutinants décrits à ce jour, les types 4, 7 et I2 ont cette propriété non seulement pour les hématies humaines O mais aussi pour certaines hématies de singes.
- Les récepteurs des globules rouges hémagglutinables par les virus ECHO ne sont pas modifiés par la trypsine ni par la neuraminidase mais sont altérés par la chymotrypsine.
- La fixation d'un virus ECHO sur l'hématie ne modifie pas le récepteur du moins quant à son aptitude à fixer à nouveau un virus de même type ou d'un autre type.
- Des hématies traitées par la trypsine pourraient devenir hémagglutinables par les virus ECHO 1 et 20 considérés jusqu'ici comme non hémagglutinants.
- Les types de virus ECHO capables de provoquer l'hémagglutination produisent tous ce phénomène à pH 7,3 - 7,4 et à 0 - 4º mais l'agglutination se fait mieux en milieu alcalin pour le type 3 et en milieu acide pour les types I9 et 29 tandis que les types 6, 7, II et I2 ne semblent pas influencés par les variations de pH entre 5,8 et 8,8.

- Au cours de la multiplication des virus ECHO sur des cellules en culture, le titre maximum infectieux, jugé par l'effet cytopathogène apparait plus tôt que le titre maximum d'hémagglutinine.

  En outre, la production d'hémagglutinine est favorisée en ensemençant la quantité minima de virus capable de provoquer des lésions cellulaires et l'on en retrouve beaucoup plus à partir des cellules que dans le liquide de survie.

- Les passages successifs de certains types 6 sur cultures cellulaires entrainent la disparition de l'hémagglutinine sans diminution cependant du titre infectieux, alors qu'ils ne modifient pas sa production pour les types 7 et II.

- Les tentatives faites pour démasquer par divers procédés une hémagglutinine non révélée jusqu'ici par les virus ECHO considérés comme non hémagglutinants ont échoué.

- Des sérums inhibant l'hémagglutination peuvent être obtenus chez le lapin par une technique dont le détail est donné. Mais les sérums contiennent des inhibiteurs non spécifiques à titre parfois élevé, qu'ils proviennent de lapin, de singe ou de cobaye, les mêmes inhibiteurs ont été constatés dans les sérums humains.

On peut les supprimer en les délipidant par l'éther et l'acétone ou en les traitant par le kaolin. Ce dernier procédé simple et pratique ne supprime pas les agglutinines anti-hématies humaines des sérums de lapins. En outre si le kaolin n'est pas complètement éliminé, il peut avoir à lui seul une action hémagglutinante.

Tenant compte des propriétés connues dont nous avons vérifié l'exactitude et de celles que nous avons pu mettre en évidence au cours de l'étude de 30 souches, nous avons proposé une méthode d'identification des types antigéniques de virus ECHO hémagglutinants, basée non seulement sur les réactions immunologiques mais aussi sur certains caractères des hémagglutinines.

Si, appliquée à un nombre suffisant de souches, elle apparait suffisamment sensible et spécifique, elle rendra plus aisée et plus économique l'identification d'un certain nombre de virus ECHO.

Le Président de la Thèse :
Professeur SOHIER

Vu et Permis d'imprimer
LYON, le 9 Juin 1962

VU, le Doyen :
H. HERMANN

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,
P. LOUIS

B I B L I O G R A P H I E

I - ANDREWES C.H.-
The common cold and other minor respiratory infections.
Brit. Med. Bull., I959, I5, 22I.

2 - ARCHETTI I., FELICIA -
I virus ECHO ed i loro rapporti con gli altri enterovirus.
Rendiconti dell' istituto superiore di sanita, I960, I3, 680.

3 - BERCOVICI B., WELSCH G., NELKEN D.-
Lytic property of human cord blood serum.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., I959, I00, 846.

4 - BUCKLAND F.E.-
Inactivation of virus haemagglutinins by para chloromercuribenzoic acid.
Nature, I960, I88, nº 4752, 768.

5 - BURSTEIN M. et SAMAILLE J.-
Sur une nouvelle méthode de dosage des lipoprotéines du sérum.
Path. et Biol., I958, 6, 54I.

6 - BUSSELL R.M., KARZON P.T., BARRON A.L. and HALL F.T.-
Hemagglutination inhibiting, complement fixing and neutralizing responses in ECHO 6 infection including studies on heterotypic responses.
J. Immunol., I962, 88, 47.

7 - CHANOCK R.M. and SABIN A.B.-
The hemagglutinin of St Louis encephalitis virus. Recovery of stable hemagglutinin from the brains of infected mica.
J. Immunol., I953, 70, 27I.

8 - CLARKE D.H. and CASALS J.-
Improved methods for hemagglutination studies with arthropod borne viruses.
Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., I955, 88, 96.

9 - CLARKE D.H. and CASALS J.-
Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod borne viruses.
Amer. J. of Trop. Med. and Hyg., I958, 7, 56I.

I0 - Committee on the Enteroviruses, National Foundation for Infantile Paralysis.
Am. J. Publ. Health, I957, 47, I956.

II - DARDANONI L. et ZAFFIRO P.-
Sul potere amoagglutinante di virus dal gruppo ECHO.
Boll. Ist. Sier. mil., I958, 37, 346.

I2 - DARDANONI L.-
La reazione di emoagglutinazione nei virus ECHO.
Boll. Ist. Sier. Ital., I960, 35, nº 2.

I3 - DARDANONI L. et ZAFFIRO P.-
Identificazione di virus ECHO a mezzo della reazione di emoagglutinazione.
Boll. Ist. Sier. mil., I959, 38, II.

I4 - DEINHARDT F., HENLE B., MARKO M.-
The effect of inhibitors on the hemagglutinating activity of polyoma virus.
J. Immunol., I960, 84, Nº 6, 599.

I5 - DUSONCHET H.-
Etude de l'hémagglutination des hématies de poussins selon la méthode de W.P. HAVENS. Résultats obtenus en pathologie hépatique.
Thèse Pharmacie I959, Lyon.

I6 - FRISCH A.W. and DAVIES G.H.-
"Complete" and "incomplete" hemagglutinin formation in the mouse.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., I959, I0I, 28I.

I7 - GOLDFIELD M., SRIHONGSE S. and FOX J.P.-
Hemagglutinins associated with certains human enteric viruses.
Fed. Proc., I958, I7, 5I3.

I8 - GOLDFIELD M., SRIHONGSE S. and FOX J.P.-
Hemagglutinins associated with certains human enteric viruses.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., I957, 96, 788.

I9 - GROSS L.-
Agglutinating action of heat inactivated passage. A mouse leutremia filtrates on mouse red blood cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., I959, I0I, II3.

20 - HAMMON N., YOHN D.S., FAVIA R.A. and SATHER G.-
ECHO virus type I3. Isolation and characteristics.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., I959, I00, 425.

21 - HALE J.H. and PILLA K.-
Observations on the haemagglutinating activity of the arthropod borne viruses.
Ann. Trop. Med. Parasitol., I960, 54, nº 2, 236.

22 - HANA L., STYK B.-
Some properties of Influenza C virus haemagglutination inhibitor from rat serum.
Act. Virologica, I959, 3, 85.

23 - HERMODSSON S.-
Effect of ultrasonic vibration on the haemagglutinating activity of some para influenza viruses.
Nature, I960, I88, nº 4757, I2I4.

24 - HIRST G.K.-
The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination.
J. Exp. Med., I942, 75, 49.

25 - HIRST G.K.-
The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus.
Science, I94I, 94, 22.

26 - HSIUNG G. .-
Some distinctive biological characteristics of ECHO IO virus.
Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., I958, 99, 387.

27 - HSIUNG G. . and MELNICK J.L.-
Comparative susceptibility of Kidney cells from different monkey species to enteric viruse (Poliomyelitis, Coxsackie and ECHO groups).
J. Immunol., I957, 78, nº 2, I37.

28 - HULL R.N., MINNER J.R. and SMITH J.W.-
New viral agents recovered from tissue cultures of monkey Kidney cells.
Am. J. Hyg., I956, 63, 204.

29 - KARZON D.T., POLLOCK B.F. and BARROW A.L.-
Plase variation in ECHO virus type 6.
Virology, I959, 9, 564.

30 - KAMITSUKA P.S., SOERGEL M.E. and WENNER H.A.-
Production and standardization of ECHO reference antisera.
Am. J. Hyg., I96I, 74, 7.

31 - KASEL J.A., ROWE W.P. and NEMES J.L.-
Modification of erythrocyte receptors by a factor in adenovirus suspensions.
Virology, 1960, 10, Nº 3, 387.

32 - KLEMPERER H.G.-
An effect of phloridzin on influenza virus elution and on neuraminidase activity.
Virology, 1960, 12, nº 3, 495.

33 - LAHELLE O.-
Inhibition of the ECHO viruses hemagglutination by specific ECHO antisera.
Act. Path. Microbiol. Scandin., 1958, 44, 413.

34 - LAHELLE O.-
Capacity of certains ECHO 6 strains to agglutinate human red cells.
Virology, 1958, 5, 110.

35 - LIM K.A. et BENYESH-MELNICK M.-
Typing of viruses by combination of antiserum pools. Application to typing of Enteroviruses (Coxsackie and ECHO).
J. Immunol., 1960, 84, 3, 309.

36 - LIPPI M., BALDUCCI M., BENEDETTO A.-
Contributo sieroimmunologico allo conoscenza delle principali virosi. Ricerca degli anticorpi fissanti il complemento ed emoagglutinoinibenti per il virus ECHO II in un campione di popolazione sana.
Arch. Ital. di Scienza Med. Trop. e di Parasitol., 1960, Fasc.II.

37 - MACRAE -
Enteroviruses.
Brit. Med. Bull., 1959, 15, nº 3, 210.

37 b - Mac INTOSH E.G.S. et SOMMERVILLE R.G.-
An analysis of 24 strains of ECHO virus type 7.
Arch. für Virusforschi, 1959, 8.

38 - MAISEL J., MOSCOVICI C. et LA PLACA M.-
Susceptibility of human tumor cells to ECHO viruses and loss of HA capacity of some of the adapted viruses.
Arch. für Virusforschi, 1961, 11, nº 2, 209.

39 - MELNICK J.L.-
Advance in the study of enterovirus.
Virology, 1958, 1, 59.

40 - MELNICK, DALLDORF, ENDERS, GELFAND, HAMMON, HUEBNER, ROSEN, SABIN, SYVERTON, WENNER -
Classification of human enteroviruses.
Virology, I962, I6, nº 4.

4I - NAKAGAWAY Y. and ISHII R.-
Studies on the virus hemagglutination using formalin-treated erythrocytes.
The Kuruma Med. J., I960, 7, nº I, 4I.

42 - OKER BLOM -
Bentonite purification of certains viruses.
Am. Med. Exp. Biol. Fenn., I955, 33, I90.

43 - PELON W., MOGABGAB W.J., PHILIPS A. and PIERCE W.E.-
A cytopathogenic agent isolated from Naval Recruits with mild respiratory illnesses.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., I957, 94, 262.

44 - PHILIPSON L. and ROSEN L.-
Identification of a cytopathogenic agent called U virus recovered from patients with non diphteric croup and from day nuresry children.
Arch. für Wirus forsch., I959, 9, 25.

45 - PHILIPSON L.-
Studies on the mechanism of hemagglutination by ECHO viruses.
Arch. für Virusforsch., I959, 9, 25I.

46 - PHILIPSON L. and CHOPPIN P.W.-
On the role of virus sulfhydryl groups in the attachement of enteroviruses to erythrocytes.
J. Exp. Med., I960, II2, 455.

47 - PHILIPSON L. and CHOPPIN P.W.-
Inactivation of enteroviruses by 2 - 3 dimercaptopropanol (B.A.L.)
Virology, I962, I6, nº 4, 405.

48 - RAMOS-ALVAREZ M. and SABIN A.B.-
Cytopathogenic enteric viruses associated with undifferentiated diarrheal syndromes in early childhood.
Am. New York Acad. Sci., I957, 67, 326.

49 - RAMOS-ALVAREZ M. and SABIN A.B.-
Characteristics of poliomyelitic and other enteric viruses recovered in tissue culture from healthy american children.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., I954, 87, 655.

50 - RAMOS-ALVAREZ M. and SABIN A.B.-
Enteropathogenic viruses and bacteria. Role in Summer diarrheal diseases of infancy and aarly childhood.
J. Amer. Med. Ass., I958, I67, I47.

5I - RENKONEN O.-
Nature of lipid inhibitors of tick-borne encephalitis virus hemagglutination. Inhibitory lipids of human serum.
Ann.Med. Exper. Biol. Penn., I960, 38, nº 4, 447.

52 - ROSEN L.-
Hemagglutination and hemagglutination inhibition with measles virus.
Virology, I96I, I3, nº I, I39.

53 - ROSEN L.-
Serologic grouping of Reoviruses by hemagglutination inhibition.
Am. J. Hyg., I960, 7I, 242.

54 - ROSEN L., HOVIS J.F., MASTROTA F.M., BELL J.A., HUEBNER R.J.-
Observations on a newly recognized virus.
Am. J. Hyg., I960, 7I, 258.

55 - ROSEN L., HOVIS J.F., MASTROTA F.M., BELL J.A., HUEBNER R.J.-
An outbreak of infection with a type I reovirus among children in an institution.
Am. J. Hyg., I960, 7I, 266.

56 - ROSEN L. and KERN J.-
Hemagglutination and hemagglutination inhibition with coxsackie B viruses.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., I96I, I07, nº 3, 626.

57 - SABIN A.B.-
A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type I0.
Science, I959, I30, I387.

58 - SALMINEN A.-
Difference in the agglutinability of rooster and ham erythrocytes by the tick borne encephalitis virus.
Ann. Med. Exper. Penn., I959, 37, 4.

59 - SALMINEN A.-
Adsorption onto and elution from erythrocytes of the tick-borne encephalitis virus.
Ann. Med. Exper. Penn., I960, 38, nº 3.

60 - SALMINEN A., ERIKSSON A. and OKER BLOM N.-
Hemagglutinating - inhibiting antibodies in the human population of an endemic area of diplasic tick borne meningo-encephalitis.
Arch. für Virusforsch.,

6I - SALMINEN A.-
Removal of tick borne encephalitis virus receptors from erythrocytes by extraction with lipid solvants.
Ann. Med. Exper. Fenn., I960, 38, nº 3.

62 - SOHIER R., CHARDONNET Y., GAUDIN G., CHALLUT, THAL F.-
Etude clinique biologique et épidémiologique de 73 cas d'infections poliomyélitiques observés en France en I957.
Path. Biol., I959, 7, nº I3-I4, I42I.

63 - SPENCE L.-
Ficin treatment of sera for removal of non specific inhibitors to asian strains of influenza virus.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., I960, I03, 425.

64 - STEIGMAN A.J., KOKKO V.P., SILVERBERG R.J.-
Mack virus - serum and gamma-globulin neutralization of unidentified agent isolated from suspected non paralytic poliomyelitis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., I953, 83, 200.

65 - TAKATSY G.Y., BARB K.-
On the normal serum inhibitors for the avid asian strains of influenza virus.
Acta virologica, I959, 3, 7I.

66 - ZAFFIRO P.-
Reazione di emogglutino - inibizione nei virus ECHO (tipi 3, 7, IO, II, I2 et I9).
Boll. Ist. Sier. Mil., I959, 38, 435.

Cette thèse était déjà terminée quand nous avons eu connaissance du travail de GILGENKRANTZ, LE MOYNE et DE LAVERGNE, paru dans les Annales de l'Institut Pasteur de Juin I962, tome IO2, nº 6, sur l'étude du pouvoir hémagglutinant dans le groupe des virus ECHO.

Les résultats obtenus par ces auteurs confirment la plupart des faits que nous avons rapportés.

-o-o-o-o-o-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION I

Chapitre I - ETUDE DE LA REACTION D'HEMAGGLUTINATION 7

A - MATERIEL ET TECHNIQUES 7

B - ETUDE DES CARACTERES DES HEMAGGLUTININES DES VIRUS ECHO I6

I - Etude des hématies hémagglutinables par les virus ECHO I6

II - Etude du récepteur sur l'hématie humaine 22

III - Etude des facteurs pouvant modifier l'hémagglutination 29

IV - Etude des modalités d'obtention des hémagglutinines 38

V - Essai de concentration de l'hémagglutinine 44

VI - Labilité des hémagglutinines de certains virus ECHO 45

VII - Essai de détection d'une hémagglutinine à partir des virus ECHO considérés actuellement comme non hémagglutinants 52

Chapitre II - ETUDE DE LA REACTION D'INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION 57

I - Préparation des sérums d'animaux immunisés 57

II - Les inhibiteurs non spécifiques présents dans les sérums 59

III - Présence d'agglutinines dans les premières dilutions de sérum 70

IV - Technique de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination 7I

Chapitre III - APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC 77

I - Identification des souches 77

II - Recherche d'anticorps inhibiteurs de l'hémagglutination dans les sérums humains 83

DISCUSSION 86

CONCLUSIONS 92

BIBLIOGRAPHIE 95